

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

CODEN : BTEEEC

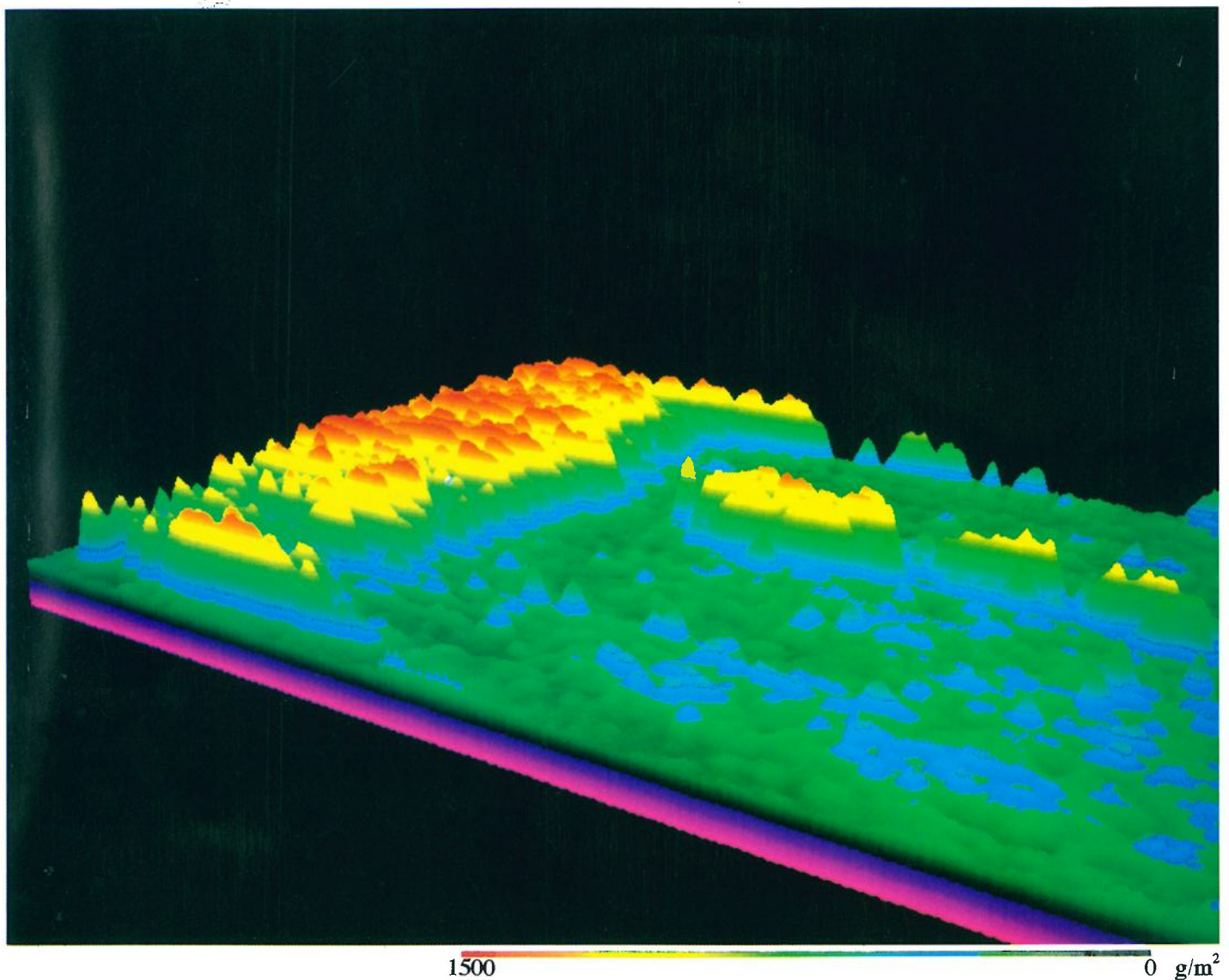
## TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

### ブレインテクノニュース

# 第 54 号

MARCH 15, 1996



コンピューターグラフィックスによるダイズ圃場のバイオマスの鳥瞰図

図中 山の高い明るい色の部分が葉がよく繁茂し、暗色で低いところは線虫害が現われている  
(本文 4 ページ参照)

## 総 説

岡田 齊夫

遺伝子組換え植物の安全性評価の現状と問題点…………… 1

## 国内情報

井上吉雄・森永慎介

低空スペクトル画像計測による植物生育情報の評価法

—農作物の生育をCGの鳥瞰図でとらえる—…………… 4

正田 誠

枯草菌の抗菌作用と遺伝子解析…………… 7

符 勇・前田昌調

海洋微生物用ベクターの開発……………13

## 地域の先端研究

鈴木正彦・庭田英子・山下一夫・長谷川 一

ニンニクウイルスフリー化後の研究の展開……………17

## 文献情報

花芽分化を誘導する遺伝子スイッチ……………22

真核生物における保存されたイニシエータタンパク……………23

コンドロイチン硫酸は「ジキル博士とハイド氏」か!?

—アテローム性動脈硬化発症との関係—……………24

## 海外便り

塚本健司

ロサンゼルスでのコロナウイルス遺伝子に関する研究……………26

## 特別情報

大澤勝次

細胞育種技術の進捗状況 1995年度……………30

# 遺伝子組換え植物の安全性評価の現状と問題点

生物系特定産業技術研究推進機構

岡田 斉夫

遺伝子組換え研究の発展は、地球環境保全への貢献、増加する人口の食料問題への貢献等に期待が寄せられている。作物における組換え体も実用化されたもの、実用化目前のものなどが続々と現れている。しかしこの技術の成果に漠然とした不安を持っている消費者があり、こうした人達に受け入れられるように社会的受容性の確保が重要な課題である。国際的に調和がとれた指針に基づいて、組換え体ごとに、段階的に、安全性評価試験の実施と、成果の適切な発表、説明が大切である。

## 1. はじめに

遺伝子組換えの基本技術が微生物を利用して生み出されてから20余年、植物で成功してから10余年を経過し、植物分野ではウイルス抵抗性、耐虫性、品質向上、除草剤耐性等の形質を導入した組換え体の作出が相次いでいる。この技術の開発当初、遺伝子組換えでは予想できない生物が作出されるかもしれない、あるいは組換え体が環境中で有害な影響を与えるのではないかなどの不安をもたれ、環境への放出実験は一時期禁止されていた。その後、様々な研究成果の蓄積にともない、この技術の成果には心配されたような危険はなく、組換え体の性質は、宿主、ベクター、導入遺伝子の性質から評価できることが理解されるようになり、規制は次第に緩和されてきた。しかし人や環境に害作用がないことの確認とは別に、漠然とした不安をもっている消費者に受け入れられるように、社会的受容性（パブリックアクセプタンス＝PA）の確保が重要な課題になっている<sup>1,7,10)</sup>。

## 2. 組換え植物作出の現状と導入遺伝子の特性

日本においては、1988年にトマトにタバコ

モザイクウイルス（TMV）外被タンパク質遺伝子を導入し、TMV抵抗性トマトが作出されて以来、約40種の植物で組換え体を作られたようで、トマト、ペチュニア、イネ、メロン、タバコ、トルコギキョウ、パレイショ、イチゴ、カーネーションなどでは安全性評価の試験が行われてきた。諸外国では、1995年末までに40種以上の植物で、7,000件近い組換え植物の野外試験が行われたようである。

遺伝子組換えによって植物を改良しようとする特性は、生育、収量、品質、食味、機械化適性、環境耐性、耐病性、耐虫性、除草剤抵抗性等の向上に関わる、人間が植物の望ましい形質と思う多くの面で組換え技術の適用が考えられる。初期の単一のウイルス病に抵抗性の植物を作る研究から、複数のウイルス病への抵抗性、耐病性、耐虫性、タンパク質の改善、耐冷性、日持ち性、花色改善等多様な特性が付与されるようになってきている。

## 3. 組換え植物の安全性評価実験の進め方と調査項目

組換え植物が環境において安全であることを確認するための実験や、利用に関する栽培は「組換えDNA実験指針<sup>2)</sup>」および「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針<sup>9)</sup>」に基づいて行う。その進め方は前者に基づく二種類の実験と、後者に基づく二種類の利用の四段階に分けられている（図1）。

OKADA Muneo

前 農林水産省農業環境技術研究所

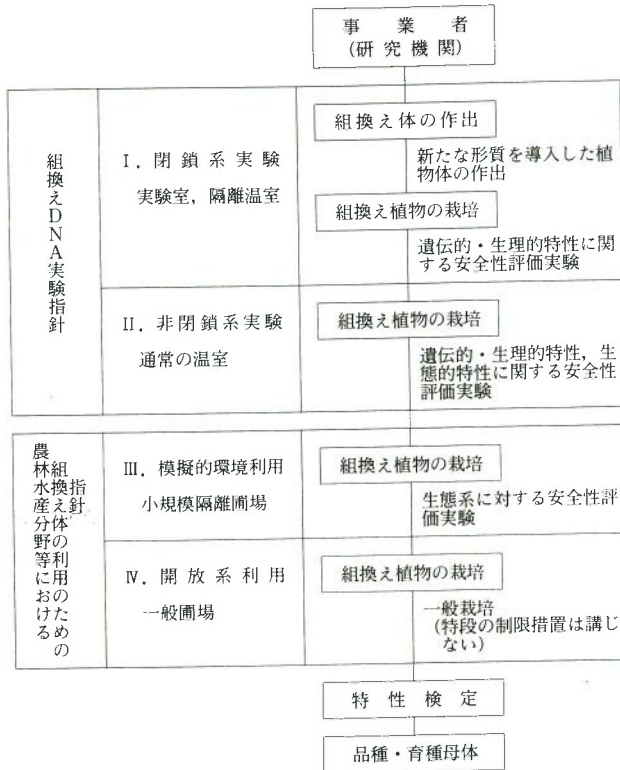


図1 組換え植物の栽培試験の実施フロー

①閉鎖系実験は通常 P1条件の実験室や隔離温室<sup>2)</sup>で、遺伝子組換え植物の創出とその遺伝的・生理的特性に関する安全性評価実験を行う。②非閉鎖系実験は通常の温室<sup>2)</sup>で、遺伝的・生理的特性に関する調査とあわせて生態的特性、すなわち組換え植物が環境に与える影響に関する評価を行う。③模擬的環境利用は野外の小規模隔離圃場<sup>3,7,9,10)</sup>で、主に組換え植物が生態系に与える影響に関する特性を中心に調査する。

実験や調査は、前記二種類の指針を具体化して次のような項目について行われている。すなわち、①生育状況、②繁殖様式、③越冬性、耐寒性、生育最低温度等、④有毒物質産生性、⑤土壌微生物相への影響、⑥遺伝子導入に利用した微生物等の除去状況、⑦導入遺伝子の特性の後世代への伝達状況、⑧周辺植物相等である<sup>3,10)</sup>。それらの調査で、導入遺伝子の特性が発現し、その特性が後代に安定して伝達されていること以外は、組換え体と非組換え体との間に差異がなく、組換え植物が環境に悪影響を与える恐れがないことが確認され、かつ各段階の実験や栽培中に、実験や栽培に影響を及ぼすようなことがなければ、



図2 イネアレルゲン遺伝子(アンチセンス)を導入したイネの隔離圃場における栽培状況



図3 キュウリモザイクウイルス外被タンパク質遺伝子を導入したペチュニアの隔離圃場における栽培状況

開放系利用では一般の圃場で普通の栽培を行うことになる(図2, 3)。

組換え植物の実験や栽培に先立ち、事業者は科学技術庁<sup>2)</sup>および農林水産省<sup>9)</sup>の指針に従って省庁に申請し、実験施設や方法等の安全性が確保されているかの検討を依頼することになっている。また事後にも結果の報告を行って、安全性の確認を必要とする<sup>2,3,5,6)</sup>。

#### 4. 安全性評価に関して行ってきたこと

各段階の試験を始める前に、農業環境技術研究所が行ってきたことは、①地元市役所の担当部長に試験の目的、内容と行動予定を説明する。②記者発表を行い新聞、ラジオ、テレビで一般の人々に、どんな考え方で、どんなことをするか知ってもらう。この際、一般説明会の計画を報道してもらって一般の人々に説明会に来ていただく。③説明会はできるだけ平易に、時間をかけて行い、質疑応答の時間も十分にとる。終了後試験を行う圃場に

案内して、試験計画、試験従事者がとる注意事項などを説明する。隠すものはない、全部話し見せましたとしてきたことである。さらに一般説明会で不十分とする方には、説明会の続きとして、市民団体などとの話し合いを行い、また質問状等にも誠意をもって回答し、理解を得る努力をしてきた。納得してくれたか否かは別として、指針に沿って評価試験を行っているとは理解されたと思っている。

### 5. 安全性確保のための指針の国際的調和と社会的受容性—おわりにかえて

研究の究極の目的は成果が実用化され社会に貢献することにある。この観点から技術の開発は重要であるが、成果が社会に受け入れられる努力も重要である。一般の人々の中には新しい技術や成果について危険視する場合もあり、安全性に関する十分な説明と理解を得る努力が必要である。

遺伝子組換えに関する技術は非常に発達しており、遺伝子導入に際して、目的とする機能以外の遺伝子が一緒に導入される危険性はないし、目的とした遺伝子の機能以外の機能が発現する可能性もないとみられている。しかし、これまでは持っていなかった特性を与えられた生物が作られること、またこの技術の成果は人類に図り知れない便益をもたらす可能性があること、宣伝されすぎたきらいもある。また一般の人々にとってもないものができるのではないかと、不安を与えたように思う。したがって、このような不安を取り除く努力が必要であり、指針に沿った安全性の評価試験が組換え体ごとに、段階的に行われることが大切である。

組換え体の安全性と社会的受容性を考える場合、組換え体が環境中に漏れ出しても、また放出されても安全であること、その安全性について社会的受容性が得られているか、さらにそれを利用して得られた食品を人が食べても安全かと言う二点がある。安全性の試験場所・回数・項目は増やせば増やすほど、安全性に対する安心感は大きくなる。しかし、現在のように世界中の人や物の流れがほとん

ど自由で、かつスピーディーになっている時代に、一国だけが独自の考え方を持つことは難しい。社会的受容性はあくまでも対象社会が受け入れるか否かの問題であるので、世界中の国々が同じような考え方を持つ必要がある。

組換え体の産業利用に向けた安全性のあり方は、国際的に経済協力開発機構（OECD）において専門家による議論が1980年代から行われている。その成果は各国の指針や管理体制などの整備に反映されており、日本の「組換え DNA 実験指針」および「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」もそれを踏まえて策定されている。新しい科学や技術が社会に受け入れられるためには、地道な研究と適用のための努力が必要で、国際的に調和がとれた指針を遵守した安全性の評価が行われたこと、その成果の節目節目の発表や説明が重要である。

### 文 献

- 1) 日野明寛 (1995) 遺伝子ターゲッティングの基礎と応用 (緒方靖哉・村上浩紀編), コロナ社, p.150-176
- 2) 組換え DNA 実験指針研究会編 (1991) 組換え DNA 実験指針—解説・Q & A—, 第一法規出版, 245pp.
- 3) 組換えトマト安全性評価研究グループ (1992) 農環研報, 8: 1-51
- 4) 本吉總男・宇垣正志 (1991) 現代化学 (増刊20), 東京化学同人, p.153-161
- 5) 農業環境技術研究所 (1981) 組換え DNA 実験安全規則, 5pp.
- 6) 農業環境技術研究所 (1990) 組換え体利用に関する業務安全規則, 5pp.
- 7) 農林水産技術会議事務局・農業環境技術研究所 (1993) 組換え体の生態系導入のためのマニュアル, 90pp.
- 8) 農林水産先端技術産業振興センター (1993) 平成4年度農林水産省委託事業成果報告書, 導入遺伝子及びマーカーの食品適性に関する調査, 169pp.
- 9) 農林水産省 (1992) 農林水産分野における組換え体の利用のための指針, 67pp.
- 10) 岡田齊夫 (1994) バイオサイエンスとインダストリー, 52(1): 19-23

国内情報

## 低空スペクトル画像計測による植物生育情報の評価法 — 農作物の生育をCGの鳥瞰図でとらえる —

農林水産省 農業環境技術研究所

井上 吉雄・森永 慎介

気球システムによって上空約150mから撮影した圃場の青・緑・赤・近赤外の反射スペクトルデジタル画像に基づいて、バイオマスおよびクロロフィル濃度を推定する手法を開発した。推定モデルと500×1000画素の波長データから植物の生育状態を定量化し、その面的分布をコンピュータグラフィクスによって高精細度の等高線図や鳥瞰図として表示できる。

### 1. はじめに

温暖化や乾燥化などの環境変動に伴う自然植生の変化、あるいは農作物の生産力へのインパクトをモニタする方法として、リモートセンシング手法への期待は大きい。

ランドサットをはじめとする人工衛星による観測は、地球規模の広域観測や長期的な変動のモニタリングには威力を発揮するが、観測周期が長いと、良好なデータが得られる確率は天候に大きく左右される。また、空間的な解像度の面からも、衛星データは大スケールのモニタリングには適しているが、農耕地、草地、森林などを含む農業生態系の植生モニタリングには、地域～局地スケールの高頻度かつ高分解能のデータを必要とする場合が多い<sup>7)</sup>。

一方、作物の調査・生育診断手法は栽培管理と作況予測の要となる技術であるが、特に最近、ふたつの新しい観点から、作物診断情報の重要性が高まっている。ひとつは環境負荷の低減化への要請が強まっていることで、必要最小限の肥料・農薬などを効果的に使うためには、作物の生育情報を的確に捉えることが必要となる。もう一つの新しいニーズは、担い手の減少や圃場の大規模化に対応した機械作業の自動化やロボット化への要請であり、ここでも作物の生育状態を瞬時に測定し診断

できる方法が必要となっている。

上記のような場面では、雲の有無などに左右されることなく、植物の生育に応じて、適時に高頻度で植生を観測できることが不可欠である。また、空間分解能も数メートル以下の高精細度のデータが期待されている。しかし、これを実現するための手法に関する研究は少なく、植生モニタリングや農場管理情報計測システムとして活用できるものはないのが現状である<sup>1,2,3,6)</sup>。筆者らの研究室では、野外や実験室レベルでの計測データに基づいて、気球、飛行船、ヘリコプタ、航空機などによる低～中高度からのリアルタイム高精細度のリモートセンシング手法の研究開発を進めている<sup>4,5)</sup>。ここでは、その一環として行った気球システムを用いたスペクトル画像計測による作物生育の面的評価法について紹介する。

### 2. 気球を用いたスペクトル画像計測システム

使用した気球は容積約7m<sup>3</sup>、紡錘形で4つの尾翼をもっており、風には比較的強い構造になっている。これにヘリウムを充填することにより、約4kg程度の機材を搭載することが可能である(図1)。

気球に取り付けたゴンドラには、2台の一眼レフカメラとカラービデオカメラ<sup>8)</sup>、無線送受信器、バッテリー、アンテナ、同期シャッター装置が搭載される。一眼レフカメラの片方は可視域を、もう一方は赤外線フィルムと赤

INOUE Yoshio, MORINAGA Shinsuke



図1 気球観測システムを上げる

外線フィルタを用いて約700nm以上の近赤外領域の光のみをとらえる。地上のテレビモニタでは、カラービデオカメラから送信された映像を常時モニタしつつ、無線操作により任意の地点で撮像することができる。また、モニタ画像のビデオ記録も可能である。このシステムでは、地上数メートルから約200mまでの高度で観測することができる。

同期的に撮影された同一視野の可視・赤外写真は、デンストメータにより青(B)・緑(G)・赤(R)・赤外(IR)の4つの広波長帯の反射輝度デジタル画像に変換される。デジタル画像の解像度は500×1000画素で、高度約150mから測定した場合の地上分解能は約2.5cm×2.5cmである(図2)。

### 3. 低空スペクトル画像によるバイオマスとクロロフィル濃度の推定

上記のようなシステムを用いて、ダイズ群落の観測を行った。観測対象としたダイズ群落は、連作してシスト線虫の影響が拡大した部分と前作にトウモロコシを作付けたことによって影響が軽減された部分を含んでおり、生育量は1.8g~1170g $m^{-2}$ 、葉面積指数で0~4.5と大幅な変異が見られた。また、葉身のクロロフィル濃度も27~45(葉緑素計値)の範囲に変異していた。

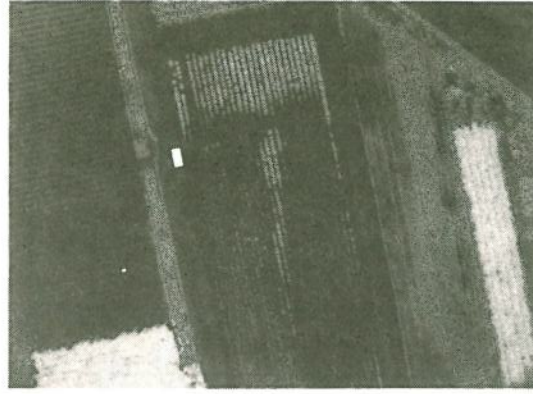


図2 上空約150mからの近赤外映像

B・G・R・I Rの4つの波長帯の反射輝度値と、ダイズ群落のバイオマス(生体重)の実測値の関係を図3に示した。バイオマスは近赤外の反射とは密接な正の相関関係( $r=0.98$ )にあり、逆に、RとBとの間には負の関係(それぞれ $r=-0.95$ および $r=-0.86$ )があることがわかった。バイオマスとGの間には予想外に低い関係( $r=0.67$ )しかなか

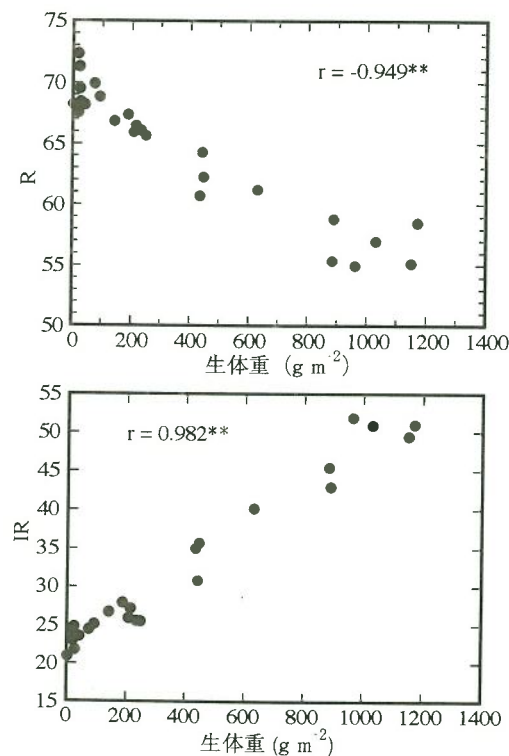


図3 バイオマスと各波長帯の輝度の関係  
—近赤外と赤のみ例示—

った(図3)。

クロロフィル濃度はいずれの単波長帯との間にも、バイオマスの場合ほど明瞭な関係は認められなかったが、GおよびIRとの間に比較的高い正の相関関係( $r=0.71$ および $r=0.75$ )が認められた(図4)。

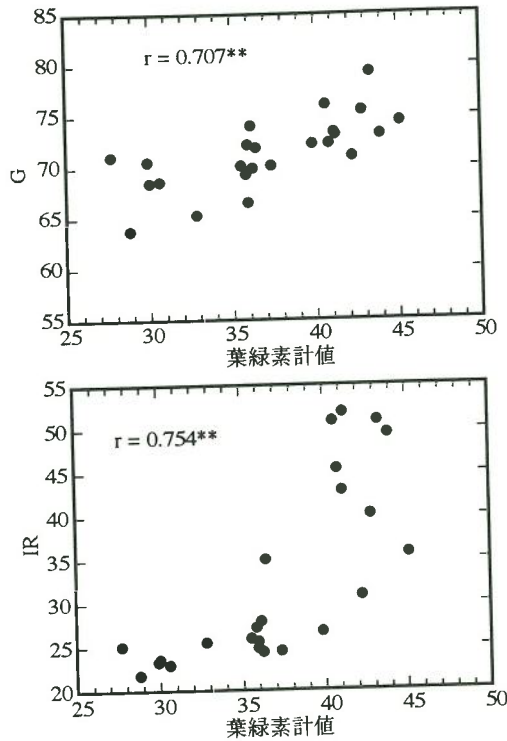


図4 葉身クロロフィル濃度と各波長帯の輝度の関係—緑と近赤外のみ例示—

4つの波長帯を用いた種々の指数（2波長の比や差、差と和の比）についても、バイオマスおよびクロロフィル濃度との関係をみた結果、バイオマスについてはIR/Gが最も密接な関係（寄与率96%）があることがわかった。しかし、クロロフィル濃度との間に密接な関係のある指数は見いだされなかった。

そこで、4波長帯を用いた重回帰分析を行った結果、バイオマスについてはIRとGの2波長を用いた場合に寄与率97.1%、平均誤差71.5g<sup>m</sup>-<sup>2</sup>の重回帰式が得られた。この場合、近赤外と緑の寄与率は約11:1であり、バイオマスの推定には近赤外の反射輝度がき

わめて効果的であることがわかる。しかし、さらに波長数を増やしても、有意な寄与率の向上は認められなかった。一方、クロロフィル濃度については、GとBを用いた重回帰式が得られたが、バイオマスにくらべると説明能力は低かった（寄与率68%、平均誤差3.0）。この場合にも、変数を増やしても説明力に有意な効果はなかった（図5）。

以上のように、バイオマスはIRとG、クロロフィル濃度はGとBの、それぞれ2波長を用いることによって比較的高い精度で面的な変異を説明できることがわかった。

上記のような評価モデルが得られれば、一つひとつの画素ごとの反射輝度値を用いて、バイオマスおよびクロロフィル濃度の面的な分布を算出することができる。さらに、コンピュータグラフィクス（CG）を使って分布データに基づいた等高線図、あるいは空中の任意の位置に眼を置いた鳥瞰図などのかたちで生育状態を表示することが可能である。表紙に示されているのは、コンピュータ上で一枚のダイズ圃場のみを切り出してそのバイオマスの分布を色と標高の違いとして鳥瞰図に表したものである。山の高い明るい色の部分は葉がよく繁茂して順調に生育しており、線虫害の現れている部分は暗色の低地として表現されている。

このような方法により、植物の活力や生育のむらを一目で定量的にとらえ、生育診断に結びつけることができると思われる。さらに、各圃場のバイオマスマップやクロロフィル濃度マップとして施肥機等の作業機に与えるな

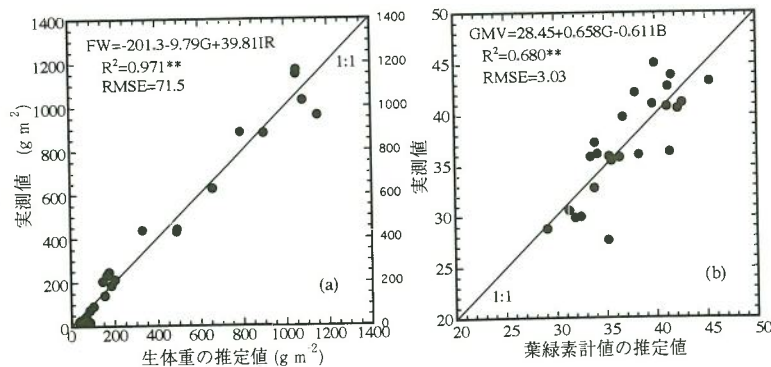


図5 2波長帯の観測値を用いたバイオマス（左）およびクロロフィル濃度（右）の推定



ど、農業機械の知能化・ロボット化の基礎情報として利用することも可能であろう。

#### 4. おわりに

大規模圃場の的確な管理、化学資材の適正利用、農業生態系の維持管理等には、圃場や小地域のスケールで、バイオマス・ストレス反応・栄養状態などの植物パラメータならびに土壌等の環境情報を面的かつ定量的にモニタすることが重要になる。本稿で紹介した気球システムによる観測の有効性はその第一歩であり、今後、各種飛行プラットフォームを活用した低空からの高頻度・高空間解像度のマルチスペクトル農業リモートセンシングシステムへと展開することが期待される。

#### 文 献

- 1) Balkeman, R. H. (1990) Applications of Remote Sensing in Agriculture, Butterworths, p.229-254
- 2) Heald, C. M. *et al.* (1972) *J. Nematol.*, 4: 298-300
- 3) Holben, B. N. *et al.* (1980) *Photogramm. Eng. Remote Sens.*, 46: 651-656
- 4) Inoue, Y. (1990) *Jpn. J. Crop Sci.*, 59: 762-768
- 5) Inoue, Y. and S. Morinaga (1995) *Jpn. J. Crop Sci.*, 64: 156-158
- 6) Komada, H. *et al.* (1988) *Bull. Natl. Agric. Res. Cent.*, 12: 55-73
- 7) Steven, M. D. *et al.* (1990) Applications of Remote Sensing in Agriculture, Butterworths. p. 1-18

#### 国内情報

## 枯草菌の抗菌作用と遺伝子解析

東京工業大学 資源化学研究所

正田 誠

我々が見いだした枯草菌 *Bacillus subtilis* NB22 および RB14 株は 28 種類以上の植物病原性糸状菌や細菌の増殖を *in vitro* で抑制する。また、トマトの根腐いちょう病や苗立枯病の抑制に有効なことがポット試験によって確認されており、微生物農薬としての可能性が期待されている。こうした広範な抑制作用が、これらの菌の生産する抗菌物質 iturin A とバイオサーファクタントの一種 surfactin によることを証明した。また、これらの物質の生合成に関与する遺伝子のクローニングを行い、両物質の制御遺伝子と思われる *lpa-14* のクローニングに成功した。こうした基礎研究を通して、今後は、多くの有効な遺伝子をこの菌に導入し、多機能型微生物農薬の創製が期待される。

#### 1. はじめに

土壌病害の防止や抑制のために多量に使用されてきた化学農薬に替わって、微生物農薬が環境にやさしい方法として、大いに注目されている。殺虫タンパク質を生産する *Bacillus thuringiensis* が世界的に実用化されて

おり、日本においてもいくつかの微生物が農薬として申請され、実用化実験が報告されてきている。しかし、微生物の機能を自然界で利用するには、植物の種類、栽培方法、気候、土壌の種類など地域固有の因子が強く、普及には越えるべきハードルも多い。その一つに作用メカニズムの解明をはじめとする基礎的な研究が不十分なことが挙げられる。

ここで紹介する枯草菌は、各種の植物病を抑制する事実に加えて作用メカニズムの解明

SHODA Makoto

表1 *B. subtilis* NB22 の菌体および除菌培養液による各種の植物病原菌に対する抑制効果 (*in vitro* 実験による阻止円の直径で示す)

植 物 病 原 菌	NB22 の菌体による阻止円の直径 (mm)	除菌液による阻止円の直径 (mm)
糸状菌		
<i>Alternaria mali</i> IFO 8984 (リンゴ斑点落葉病菌)	21	33
<i>Cercospora kikuchii</i> NIAES 5039 (ダイズ紫斑病菌)	28	40
<i>Phytophthora infestans</i> IFO 5547 (トマト疫病菌)	25	30
<i>Phytophthora capsici</i> 09001 (カボチャ疫病菌)	23	n.d.
<i>Botrytis cinerea</i> Bot 1 (キュウリ灰色かび病)	40	34
<i>Rhizoctonia solani</i> NIAES 5219 (イネ紋枯病菌)	40	38
<i>Rhizoctonia solani</i> K-1 (ケイトウ立枯病菌)	23	n.d.
<i>Rhizoctonia solani</i> MAFF 03-05223 (シバの病原菌)	38	20
<i>Pyricularia oryzae</i> NIAES 5001 (イネいもち病菌)	40	35
<i>Cochliobolus miyabeanus</i> NIAES 5425 (イネごま葉枯病菌)	32	33
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> NIAES 5117 (キュウリつる割病菌)	10	n.d.
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> race J1 SUF 119 (トマト萎ちょう病菌)	21	18
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i> KEF2R-1 (トマト根腐れ萎ちょう病菌)	21	20
<i>Fusarium moniliforme</i> H-110 (イネばか苗病菌)	21	n.d.
<i>Fusarium roseum</i> f.sp. <i>cerealis</i> 030201 (トウモロコシ立枯病菌)	16	n.d.
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i> 02010402 (イチゴ萎黄病菌)	16	n.d.
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>spinaciae</i> 0201501 (ホウレンソウ萎ちょう病菌)	15	n.d.
<i>Pythium ultimum</i> Trow H-1 (野菜苗立枯病菌)	25	25
<i>Verticillium dahliae</i> Klebahn V-3 (トマト半身萎ちょう病菌)	18	n.d.
<i>Gibberella zeae</i> 030101 (コムギ赤かび病菌)	29	n.d.
細菌		
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i> IFO 3998 (イネ白葉枯病菌)	35	25
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i> QN 8206 (カンキツかいよう病菌)	29	n.d.
<i>Pseudomonas caryophylli</i> A (カーネーション萎ちょう細菌病菌)	14	n.d.
<i>Pseudomonas solanacearum</i> TOM-w (トマト青枯病菌)	23	18
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> P1-7415 (キュウリ斑点細菌病菌)	25	25
<i>Pseudomonas glumae</i> Ku 8106 (イネもみ枯細菌病菌)	13	n.d.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ku 7501 (根頭がんしゅ病菌)	14	n.d.
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> B9 (ブロッコリー軟腐病菌)	14	n.d.

n.d.: 測定せず。

および遺伝性レベルでの解析がかなり進んでいる。今後は遺伝子操作を含むバイオテクノロジー全般を植物バイオに広く応用する時代がくると考えられ、微生物農薬も新しい展開が期待される。

## 2. 枯草菌による植物病原菌抑制の例

我々が分離した枯草菌 *Bacillus subtilis* NB22やRB14は菌そのものおよび培養した培養液から菌を除去した上清液が各種の病原菌に対して *in vitro* で抑制効果を示す。その結果の一部を表1に示す。NB22の抗菌スペクトルが広く、病原性糸状菌ばかりでなく病原性細菌に対しても抗菌性を示すことが特徴である。ポット試験では *Fusarium oxysporum*

f. sp. *radicis-lycopersici* による根腐いちょう病や *Pseudomonas solanacearum* による青枯病を抑制することが証明されている<sup>8)</sup>。

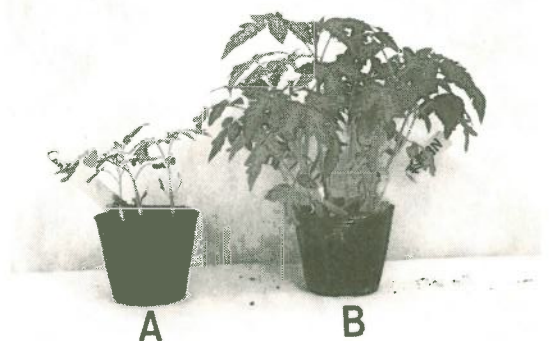


図1 枯草菌 *Bacillus subtilis* NB22 によるトマトの病害抑制試験

植物病原菌: *Rhizoctonia solani*  
病名: 苗立枯病  
A: 対照  
B: NB22菌の培養液を添加

*Rhizoctonia solani*が引き起こすトマトの苗立枯病に対する*B.subtilis* NB22の効果を図1に示す。

3. 枯草菌の生産する抗菌性物質

表1から除菌した培養液が抗菌性を示すことから、この枯草菌は菌体外に抗菌性物質を生産していると予想され、その物質の構造決定を行った。その結果、抑制物質は環状ペプチド抗生物質イチュリン (iturin A) であると同定された。このiturin Aの構造を図2に示す。この物質は7個の $\alpha$ -アミノ酸に $\beta$ -アミノ酸が結合し環状構造を取り、この $\beta$ -アミノ酸に種々の側鎖Rが結合して、6種類の同族体を形成する。

枯草菌*B.subtilis* NB22およびRB14は抗菌物質iturin A以外にバイオサーファクタントの一種であるサーファクチン (surfactin) も生産することがわかった。surfactinの構造を図2に示す。この物質も7個の $\alpha$ -アミノ酸からなり環状構造をとることはiturin A

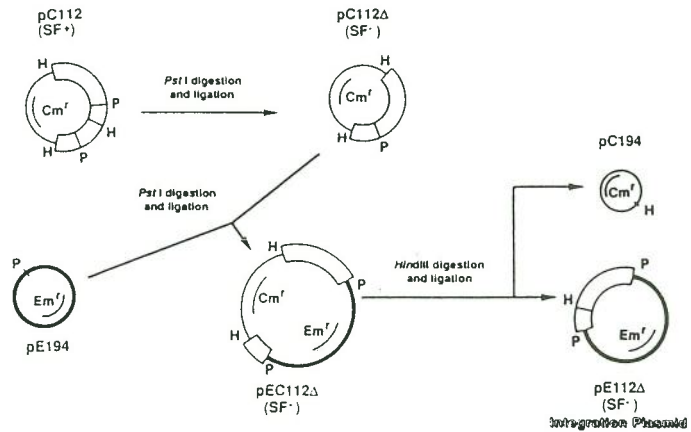


図3 挿入性プラスミドpE112Δの作成手順  
H : HindIII P : PstI  
太線はプラスミドpE194を示す

と同じであるが、構成アミノ酸の種類は両物質で異なり、かつiturin Aの $\beta$ -アミノ酸結合部分がsurfactinでは $\beta$ -ヒドロキシカルボン酸のエステル結合になっている。surfactinも抗菌性はあるもののiturin Aと比較すると非常に弱く、むしろバイオサーファクタントとしての作用は生物由来の物質の中で最も大きい。例えば500 mg/lのsurfactinを水に入れると、表面張力が75mN/mから25mN/mに低下する。表面張力を30mN/m以下に低下させるバイオサーファクタントはあまり存在しないことから、surfactinの界面活性の大きさがわかる。

これら性質が異なる二種類の物質が生産されることから、枯草菌による植物病原菌抑制作用が両物質の相乗効果によるものと考えられる。PDA培地 (ポテトデキストロース-寒天培地) のプレートにiturin A (濃度を変化) およびsurfactin (100 ppm) を混合し、別途固体培養した糸状菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race J1) の寒天片を切り取り、プレートの中央にのせ、7日後の糸状菌の増殖面積を比較した。対照としてiturin Aのみ、またはsurfactinのみを各種濃度に入れたプレートを用いた。表2に示すようにiturin Aおよびsurfactin両物質の混合により糸状菌の増殖がiturin A単独の場合より低濃度で抑制されており、両物質の相乗効果と判断できよう<sup>3)</sup>。

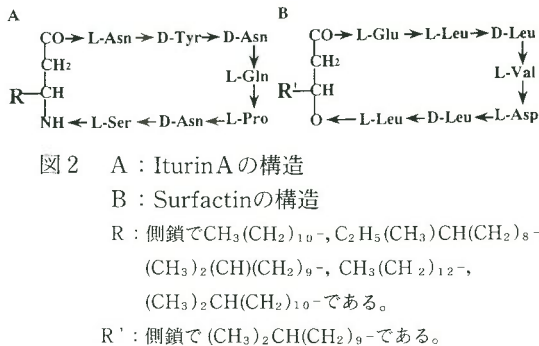


図2 A : IturinAの構造  
B : Surfactinの構造  
R : 側鎖でCH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>(CH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-である。  
R' : 側鎖で(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-である。

表2 surfactinのiturin Aに対する相乗効果 (植物病原菌 *Fusarium oxysporum* を使用したプレートの増殖試験)

添加物質	<i>F. oxysporum</i> の増殖*					
	添加濃度 (μg/ml)					
	0	6.25	12.5	25	50	100
Iturin A	+++	n.t.	+	+	+	-
Surfactin	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Iturin A +100μg/ml surfactin	+++	n.t.	+	-	-	n.t.

n.t., 試験せず  
\* ; +++ : 阻害無し + : 阻害有り - : 増殖無し

表3 *B. subtilis* NB22のプラスミドによる形質転換法の比較

使用プラスミド	コンピテントセル法		プロトプラスト法		KCl法	
	$\mu\text{g DNA}$ 当りの形質転換株	形質転換頻度	1ml培地当りの形質転換株*	再生株当りの形質転換頻度	$\mu\text{g DNA}$ 当りの形質転換株	形質転換頻度
pC194	$4.3 \times 10$	$2.3 \times 10^{-7}$	$3.8 \times 10$	$3.5 \times 10^{-6}$	$4.1 \times 10^3$	$3.3 \times 10^{-3}$
pUB110	$2.0 \times 10^2$	$1.1 \times 10^{-6}$	<10	$<9.2 \times 10^{-7}$	$1.5 \times 10^3$	$7.2 \times 10^{-4}$

\*:  $10 \mu\text{g}$  のプラスミド DNA を含む。

#### 4. 抗菌物質合成に関する遺伝子のクローニング

ここで示したiturin Aや surfactinの生合成経路については未だに不明であるが、図2に示す構造から、リボゾーム系で合成されず、非リボゾーム系のマルチエンザイムシステムによる合成が考えられる。両物質の合成に関与する遺伝子のクローニングを行うことは、本菌の基礎的な生化学的な解析を行う上で、また抗菌物質の生産性を向上するために必要であり、以下の研究を行った。

##### 4-1. 形質転換系の開発

ここで用いた枯草菌は野生株であり、菌の持つ外来遺伝子に対する制限修飾系が強く、既存の遺伝子操作方法が有効に活用できない。そこで、野生株にも適法できる遺伝子導入法の開発を行った。

##### 4-1-1. KCl法<sup>1,2,5)</sup>

枯草菌の形質転換法としては、コンピテントセル法とプロトプラスト法が用いられている。前者は簡便な方法であるが、モノマーDNAには使用できないし、また使用できる菌株が限定される。一方、後者はモノマーDNA、リニアードNAも使用でき、かつ応用できる菌株の範囲が広い。しかし非常に手間のかかる方法である。我々は、枯草菌NB22およびRB14に上記二法を適用したが、形質

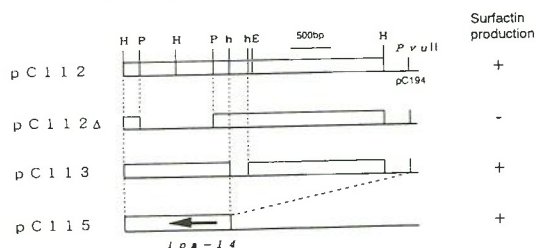


図4 *lpa-14* 遺伝子のマッピング  
E: *EcoRI*, H: *HindIII*,  
h: *HpaI*, P: *PstI*

転換株を効率良く得ることが出来なかった。特に、プロトプラスト法では、再生培地において、菌が極めてムコイド状のコロニーとなり、取り扱いが困難であった。そこで、アルカリ金属イオン ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) を用いる新しい形質転換法を開発した。この方法を用いるとプラスミドpC194が野生株に効率よく形質転換されたが、その手順は(a)菌の集菌、(b)  $\text{K}^+$ 処理、(c)プラスミドの添加、(d)ポリエチレングリコール (PGE) 6000の添加、(e) PGEの除去である。この間、約1時間の操作である。410 mM KClと30% PEGを使用すると最適状態であり、形質転換体が出現する効率が1000個/ $\mu\text{g DNA}$ であった。特別な機器類も不要で、非常に簡便な方法である。表3に3つの方法を比較した結果を示す。 $\text{K}^+$ イオンにより遺伝子を取り込まれるメカニズムとしては、 $\text{K}^+$ の処理により枯草菌の自己消化が促進され、この状態で外来DNAが導入されると考えられる。(d)のPEG処理後、 $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ イオンを添加すると形質転換効率が向上するが、これらのイオンが自己消化を阻害し、正常な細胞へと変換するためと考えられる。実際、自己消化能の欠損変異株を用いると、形質転換株は得ることができない。

##### 4-1-2. エレクトロポレーション法<sup>4)</sup>

エレクトロポレーション法は各種の細菌に遺伝子を導入する方法として利用されているが、最適な条件はそれぞれの菌に対して確立する必要がある。そこで枯草菌NB22およびRB14に関して最適化を試みた。使用した機器はCell Porator (BRL Life Technologies Inc.) でありこれを用いて、大腸菌で確立している方法で、枯草菌NB22にプラスミドpC194, pUB110を形質転換してもほとんど遺

LPA14	1	:	MK IYGVYMDRPLSAGEEDRMWAASAEKREKRRFYHKEDAHRTLIG
SFP	1	:	MK IYGIYMDRPLSQEENERFMTFISPEKREKRRFYHKEDAHRLLG
PSF-1	1	:	MK IFAIQLQLDDKNARKQIEQLKPFVSEKRAAAERFRLIDARRLLG
ORFX	1	:	IDRHVFNFLSSNVSKKQAFVRYVNVKDAYRSLG
LPA14	48	:	DM LIRTAATAAKAYGLDPAGISFGVQYEGKPYIPALPDMHFNISHSGRWIVC
SFP	48	:	DVLVRSVISRQYQLDKSDIRFSTQYEGKPCIPLPDAHFNISHSGRWIVG
PSF-1	51	:	EVLIRHIHEMYALPMEQIFETEGNGKPVVRQIPSFHFNLSHSGDWVVG
ORFX	37	:	ELLIRKYLIVQLNIPNENILERKNEYGKPFV--DFDIFENISHSDEWVVC
LPA14	98	:	AVDSKPIGIDIEKMKPGTIDIAKRFFSPTEYSDLQAKHPDQTDYFYHLW
SFP	98	:	AFDSQPIGIDIEKTKPISLEIAKRFFSKTEYSDLLAKDKDEQTDYFYHLW
PSF-1	101	:	AVDDAPVGIIDIEEIKPIDLAIAERFFSADEYQDILLSQPAERQEAFFHLW
ORFX	87	:	AISNHPVGIIDIERISEIDJKIAEQFFHENYIWLQSKAONSQVSSFFELW
LPA14	148	:	SMKESFVKQAGKGLSPLDSFSVRLKDDGHVSIELPDGHEPCFIRTYDAD
SFP	148	:	SMKESFVKQEGKGLSPLDSFSVRLHQDQVSIELPDSHSPCYIKTYEVD
PSF-1	151	:	SMKEAFIKLTGKGISYGLSSFTARLSEDDQATLRLPDPHEAPCVVQTYSLD
ORFX	137	:	TIKESYIKAIKGMYPINSEFWIDKNQQTQVIYKQNKKEPVTIYEPelfe
LPA14	198	:	EEYKLAVCAAHPDFCDGIEMKTYEELL
SFP	198	:	PGYKMAVCAAHPDFPEDITMYSYEELL
PSF-1	201	:	PAYQMAVCTRKPAAAEHVEILTENMLSRLLNV
ORFX	187	:	-GYKSCCCSLFSSVTNLSITKLQVQELCNLFLD

図5 *B. subtilis* RB14由来のLPA-14のアミノ酸残基の配列

SFP: *B. subtilis* OKB105 由来  
 PSF-1: *B. pumilus* 由来  
 ORFX: *B. brevis* 由来

伝子の導入が起こらない。しかし25%のPEG6000を添加すると効率が向上し、0.1Mマンニトールの添加も有効であった。菌濃度は高い方が効率が良く、添加DNAは1 $\mu$ gまでは直線的に効率が向上した。印加電圧が15.6 kV/cmで10<sup>7</sup>個/ $\mu$ gDNAの形質転換効率となった。前述のKCl法より1000倍以上の効率であるが、この方法で、他の枯草菌を形質転換してもNB22ほどの効率が出ないことから、それぞれの菌に対する最適条件の設定の重要性が明らかになった。

#### 4-2. 抗菌物質遺伝子のクローニング<sup>6)</sup>

iturin Aおよびsurfactinの合成に関係した遺伝子のクローニングを試みた。RB14株の染色体遺伝子を枯草菌 *B. subtilis* MI 113 (iturin A, surfactinの非生産株) に上記KCl法でショットガンクローニングを試みた。この時使用したベクターはpTB 522 (10.5 kbp) である。判定はトリブチリンを塗布したプレートを用い、トリブチリン上でハローを形成する株を選択した。約40,000個の形質転換体から2株、目的の変異株を取得し、そのプラスミドの一つをpIB 111とした。このプラスミドを抽出し、制限酵素で切断したところ、ベクターpTB 522とRB14株由来の遺伝子からなることを確認した。MI 113 (pIB 111) 株を培養したところ、培養液にはsurfactinのみが検出され、iturin Aは生産

されないことが判明した。pIB 111のベクターpTB 522を小型ベクターpC 194 (2.9 kbp) に交換し、さらに小型化を行い、*Hin*d IIIの2断片を含む、pC 112を得た。この遺伝子を *lpa-14* (約1kbp) と命名し、この遺伝子の元株、RB14株における機能を検討するため、RB14株の *lpa-14* 遺伝子欠損株を図3に示す手順でとった。pC 112の *Pst* I断片を除去したpC 112 $\Delta$ を作成し、このプラスミドのsurfactinの生産能を欠損させた。これをプラスミドpE 194とライゲーションし、pEC 112 $\Delta$ を作成し、さらにこれからpC 194断片を削除した挿入型プラスミドpEC 112 $\Delta$ を得た。ここでプラスミドpE 194は、エリスロマイシン耐性 (Em<sup>r</sup>) を示し、複製開始点が温度感受性のため、45°C以上の温度では複製できない。またこのプラスミドは染色体との組換えをおこして染色体に挿入される。そこで45°CでEm存在下で培養すると出現してくるコロニーはRB14株の染色体の *lpa-14* と同源性部分に挿入された *lpa-14* 欠損変異株となる。pEC 112 $\Delta$ を上述のエレクトロポレーション法でRB14株に導入し、目的の変異株R $\Delta$ 1を得た。R $\Delta$ 1株はiturin Aも surfactinも生産しなくなった。しかしR $\Delta$ 1株にpIB 111を再導入したR $\Delta$ 1 (pIB 111) 株はiturin Aと surfactinとを生産する。このことから遺伝子 *lpa-14* はiturin Aと sur-

factinとの生合成に関与する制御遺伝子であると考えられる。

#### 4-3. *lpa-14*の特徴<sup>7)</sup>

図3のpC112はRB14株のiturin Aと surfactin生産に関与する遺伝子を保持しているがどの部分に*lpa-14*が存在するかをpC112を小型化して調べた。図4のpC112Δ(*PstI*-*PstI*断片を削除)はsurfactin非生産性となり、pC113(*HpaI*-*HpaI*断片削除)およびpC115はともにsurfactinは生産したことから図の矢印部分が*lpa-14*であると考えられる。pC115の*Hin d III*-*HpaI*断片(1.1kbp)の塩基配列を決定したところ224個のアミノ酸残基からなるORFが存在した。塩基配列を基に、LPA14のアミノ酸の配列を図5に示す。SFPは*B. subtilis* ATCC 21332由来のsurfactin生産に関与する遺伝子*sfp*に対応するアミノ酸配列である。またPSF-1は*B. pumilus* A-1株でクローニングされた*psf-1*に対応するアミノ酸配列であり、ORFXは*B. brevis*のgramicidin S生産に関係する遺伝子*orfX*に対応する配列である。LPA14はこれらの配列と高い相同性を示す。興味深いことに*psf-1*遺伝子をRΔ1株に形質転換するとRΔ1株はiturin Aと surfactinともに生産する。この事実から、これらの遺伝子群はそれぞれの菌で類似の機能と役割をもつものと推定される。

#### 5. 今後の展望

枯草菌NB22およびRB14はそれ自体各種の植物病原菌に対して増殖抑制作用を示し、この作用物質も明らかにした。また、これらの野生株の形質転換系も完成しており、外部から遺伝子を導入し、新しい菌へと改良することができる。植物病原菌抑制に関与する他の遺伝子を導入した多機能型の微生物農薬も可能となろう。その一例として、*Bacillus*

*thuringiensis*の生産するBTタンパク質遺伝子をNB22株に導入し、殺虫作用と病原菌抑制との両機能を持つ枯草菌をつくることにも成功している。

日本においては枯草菌を微生物農薬として用いた報告がほとんど行われていない。枯草菌は納豆菌と類縁であり、日本においては長年にわたって安全性が確かめられてきたといえよう。また、特に病原性の報告もなく、遺伝的、かつ生化学的な基礎データは大腸菌に次いで多く、遺伝子組換え体の宿主としても安全性が確認されている。また菌体外に種々の物質を排出するシステムをもつなど、他の菌に無い特徴を有している。ここで述べた枯草菌の病害抑制のメカニズムの解明と遺伝子レベルでの解析は土壌におけるこの菌の挙動とも関係することも明らかにしており<sup>9)</sup>、今後、効果の高い菌への改良を加える上でも基礎データが有効に利用されることになる。

#### 文 献

- 1) Ano, T., A. Kobayashi and M. Shoda (1990) *Biotech. Letts.*, 12 : 99-104
- 2) Matsuno, Y., H. Hiraoka, T. Ano and M. Shoda (1990) *FEMS Microbiol. Letts.*, 67 : 227-230
- 3) Hiraoka, H., O. Asaka, T. Ano and M. Shoda (1992) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 38 : 635-640
- 4) Matsuno, Y., T. Ano and M. Shoda (1992) *J. Ferment. Bioeng.*, 73 : 261-264
- 5) Hiraoka, H., T. Ano and M. Shoda (1992) *J. Ferment. Bioeng.*, 74 : 241-243
- 6) Hiraoka, H., T. Ano and M. Shoda (1992) *J. Ferment. Bioeng.*, 74 : 323-326
- 7) Huang, C. C., T. Ano and M. Shoda (1993) *J. Ferment. Bioeng.*, 76 : 445-450
- 8) Phae, C. G., M. Shoda, N. Kita, M. Nakano and K. Ushiyama (1992) *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 58 : 329-339
- 9) Asaka, O., T. Ano and M. Shoda (1996) *J. Ferment. Bioeng.*, 81 : 1-6

## 海洋微生物用ベクターの開発

農林水産省 養殖研究所 環境管理部 餌料生物研究室

符 勇\*・前田 昌調

本研究は、海洋微生物の遺伝子操作に利用できる宿主・ベクター系の開発を目的としている。海洋細菌株から分離したプラスミドpTS1の全塩基配列を決定、さらにその複製起点領域を特定した後、pTS1と大腸菌ベクターによる組換え体プラスミド pMAF1 を作製した。pMAF1は大腸菌内と海洋細菌（SC9株）内でも発現したことから、シャトルベクターの機能を有していることがわかった。

### 1. はじめに

現在、養殖および栽培漁業の種苗生産では、対象魚介類が多様化したため、栄養的に優れた新しい餌料生物が求められている。しかし、新たな餌料の探索に困難をとまなう場合もあるため、遺伝子の操作により有効な機能を付加した新餌料微生物の作出が期待されている。

微生物の遺伝子を変えようとするときには、遺伝子の運び屋「ベクター」を使う。通常、ベクターは細菌等の細胞内に存在するプラスミドから作られる。現在のところ、遺伝子の組換え実験に使用されているベクターは大腸菌等の陸上起源の微生物プラスミドより作られたものであり、海洋微生物遺伝子のクローニングを目的とした宿主・ベクター系は開発されていない。陸上起源のベクターは海洋微生物に導入されたとき機能しないことがあるため、海洋微生物独自のベクターの開発が求められている。

養殖研究所餌料生物研究室では、海洋微生物や餌料用単細胞生物の遺伝子操作技術の基盤となる外来遺伝子発現宿主・ベクター系の開発を目指している。これまでに海洋細菌由来のプラスミドをベクターとして構築し、かつその有用性を検証したので紹介する。

### 2. 海洋細菌株からのプラスミドの分離

プラスミドは宿主染色体とは独立に自己増殖し、次の世代に遺伝する因子（DNA）である。細胞の生存に必要なとはされていないが、プラスミド上の遺伝子により、細胞は種々の形質を獲得する。プラスミドは宿主染色体（約400万塩基対）に比べ、1～300千塩基対と遙かに小さいため、無傷で容易に分離精製することができる。しかも、高コピー数のプラスミドDNAの場合には、大量精製が可能である。プラスミドの構造は自己の増殖を制御する部分（複製起点）と他の機能部分とに区別され、自己増殖に関与しない部分に薬剤耐性など種々の形質発現に関わる遺伝子を付加もしくは欠失させることができる。以上のような性質により、遺伝子操作においてはプラスミドは異種の目的遺伝子を細菌等の宿主に導入するためのベクターとして改変し利用される。

海洋微生物用ベクターを開発するためには、まず海洋細菌等からプラスミドを分離する必要がある。海洋細菌とは、広義的には、海洋環境で増殖し、生存を続けている細菌といえる。ここでいう海洋環境は、外洋の海水や海底堆積物だけではなく、汽水域や動植物の体表・体内を含むあらゆる海の環境を指している。海洋細菌の中では、少数の菌株のみがプラスミドを保有するといわれている。私達はZoBell 2216E寒天平板培地を用いて、ワム

Fu Yong, MAEDA Masachika

\* 科学技術特別研究員（現所属：芙蓉海洋開発株式会社）

シ、ガザミ、クルマエビ、ナマコ、サザエ、アカウニ、ムラサキウニなどの海洋生物の消化管あるいはその飼育水から、段階希釈法 ( $10^{-3}$ から $10^{-6}$ まで) により、28株の海洋細菌を分離した。これらの菌株は分離後、平板培地によって継代保存した。

通常の細菌からのプラスミド抽出精製には、アルカリ溶菌法をはじめ、プラスミド自動抽出精製装置や市販キットの利用など幾つかの方法が用いられている。しかし、海洋細菌は陸上細菌よりも多糖類等を多く含有するため、常法による高純度プラスミドの抽出が難しい。したがって、既存の方法を海洋細菌に用いる場合には、どの方法がより適当かを検討する必要がある。本研究ではアルカリ溶菌法、プラスミド自動抽出装置 (島津製) による方法、QIAGEN Plasmid Kit (QIAGEN 社製) 法を用いて、海洋細菌からプラスミドを抽出し、その純度を比較した。その結果、海洋細菌の場合は、QIAGEN Plasmid Kitによる抽出精製が最適と判断するに至った<sup>1)</sup>。

海産動物等から分離した28の菌株についてプラスミドの抽出を行い、アガロースゲル電気泳動により細菌のプラスミド保持の有無を調べた。その結果、SIC2 (ガザミ飼育水より分離、菌の分類グループ: *Vibrio*)、SC10 (ナマコ消化管, *Pseudomonas* グループ)



図1 海洋細菌から抽出精製したプラスミドDNA  
 レーンλ: λ DNA/*Hind*III (分子量マーカー)  
 レーン1: pSIC2/*Pst*I (約7.4kbp)  
 レーン2: pSC10/*Pst*I (約6.3kbp)  
 レーン3: pTS1/*Pst*I (約6.5kbp)

とTS1 (サザエ消化管, *Vibrio*グループ) の3菌株のみがプラスミドを保有していた<sup>1)</sup> (図1)。電気泳動によって測定した3プラスミドの大きさは、SIC2株のプラスミドpSIC2が約7.4kbp, pSC10が約6.3kbp, pTS1が約6.5kbpであった。

プラスミドをベクターとして構築する場合には、サイズの小さいものを用いたほうが種々の大きさのDNAを挿入するとき都合がよい。さらに、プラスミドが多くの制限酵素サイトを保持している場合には、プラスミドの構造解析のためのサブクローニングや外来遺伝子の挿入場所の選択などにおいて有利となる。このような理由から、本研究ではTS1株のプラスミドpTS1を海洋細菌用のベクターを構築するプラスミドとして採用した。

### 3. プラスミドpTS1の塩基配列決定

pTS1をベクターとして構築するには、そのプラスミドの全塩基配列を決定し、機能部位の解析を行う必要がある。私達は図2に示した方法で、pTS1をpMB9由来のプラス

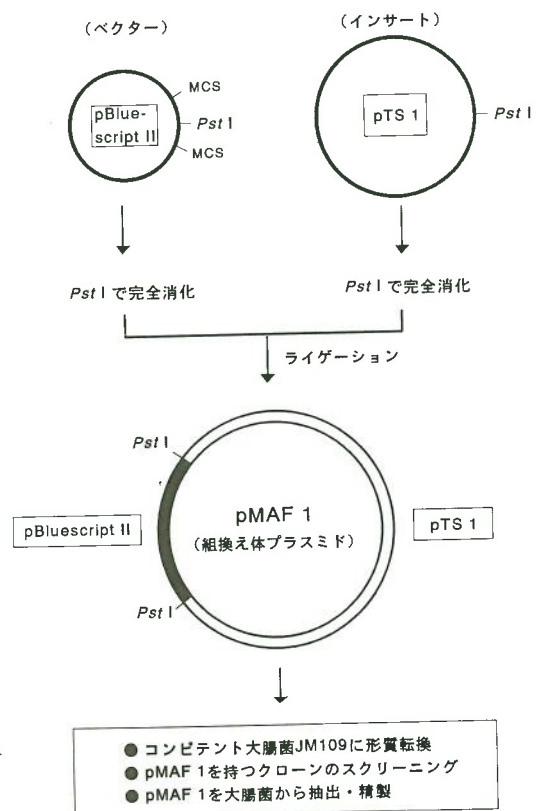


図2 組換え体プラスミドpMAF1の作製



ミドベクター-pBluescript II KS-のマルチクローニングサイトに組み込み、pTS1とpBluescript II KS-との組換え体プラスミドpMAF1を作製した<sup>2)</sup>。そしてpBluescript II KS-側にあるT3やT7などのプライマーを用い、デオキシ法によりpTS1の塩基配列の決定を行った。しかし現行の方法では、1つのクローンのプライマーアニーリング部位から1回の反応で読み取れるpTS1の塩基数はせいぜい300~500bpである。このため、pTS1(約6500bp)の全塩基配列を決定するために、ExoIII/Mung bean nuclease法により、pMAF1の中のプライマーをアニーリングする側の末端から段階的に200~300bpずつ欠失した、サブクローンのセットを作製した(図3)。泳動図の左側から右側へと段階的にプラスミドが約200bpずつ小さくなっている。これらのサブクローンについてシーケンシングを行うことにより、pTS1の全塩基配列を決定した。全塩基数は6847bpで、アガロースゲル電気泳動によって測定した大きさ(約6.5kbp)とほぼ一致した。

プラスミドpTS1の複製起点(ori)など機能部位の領域を特定するために、決定した全塩基配列と、データベースSDC-GENETYXの中に報告されているori関連の配列とのホモロジー検索を行った。しかし、相同性の高い領域は検出されなかった。この結果から、海洋細菌由来のプラスミドpTS1のoriは既知の大腸菌などのプラスミドのoriとは大きく

異なり、おそらく今まで報告されていない塩基配列によって構成されているものと考えられた<sup>2)</sup>。さらに、pTS1の塩基配列を様々な既知の遺伝子の塩基配列と比較しても、ホモロジーの高い遺伝子は見つからなかったため、pTS1は新規の遺伝子と考えられた。決定した塩基配列により、pTS1の制限酵素地図を作製したところ、多くの切断部位の存在することがわかった。

#### 4. pMAF1の海洋細菌細胞への導入

pMAF1は、pTS1にアンピシリン耐性遺伝子とCol E1 ori(大腸菌ori)を組み込んだ組換え体プラスミドである。したがって、本プラスミドは大腸菌の宿主中では当然複製できるが、もし、*Pst*IサイトがpTS1のoriを切断していないならば、pMAF1は海洋細菌の中でも発現する可能性が高いと考えた。

pMAF1を海洋細菌へ導入する方法としては、塩化カルシウム処理法と接合伝達法とがあるが、前者の方法では形質転換効率が低く<sup>3,4)</sup>、さらに宿主として使用する海洋細菌がコンピテント化できない可能性もある。そこで、本実験では、接合伝達法<sup>5)</sup>を用いた。供与菌として組換え体プラスミドpMAF1を持つ大腸菌HB 101を用い、受容菌としてプラスミドを持たず、かつアンピシリン耐性を示さなかった海洋細菌SC9(*Tc*<sup>r+</sup>)を用いた。また、pMAF1の海洋細菌内への移動を

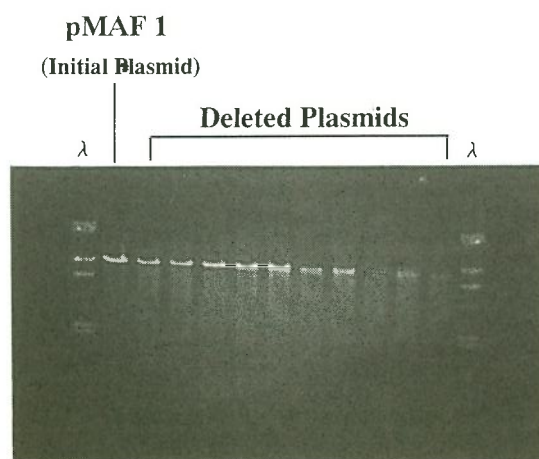


図3 pTS1の塩基配列決定に用いたサブクローン

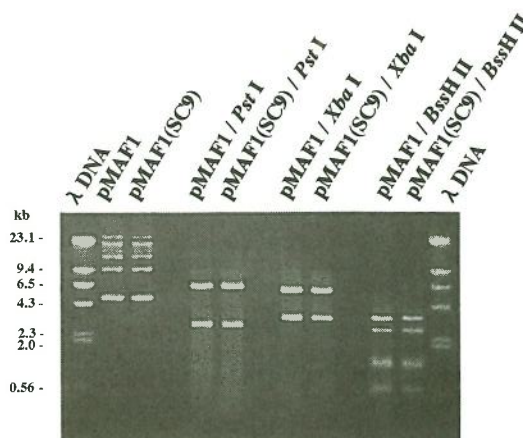


図4 大腸菌および海洋細菌(SC9)中に導入された組換え体プラスミドpMAF1各制限酵素で切断しても同一パターンを示した。

助けるために、接合伝達能を持つヘルパー・プラスミド pRK2013 を用いた。pRK2013 自身は、海洋細菌内では維持されないため、pMAF1 の移動を助けた後に宿主細胞から脱落してしまう。これら供与菌、受容菌およびヘルパー・プラスミドをもつ大腸菌の 3 者を混合して適当な条件下で培養し、 $1.6 \times 10^3$  コロニー/ $\mu\text{g}$  DNA の形質転換効率で海洋細菌接合体を得た。プラスミドの抽出を行った結果、すべての海洋細菌接合体から pMAF1 が検出され (図 4)、pMAF1 が海洋細菌内へ効率良く導入され発現することが明らかになった。一方、同方法で大腸菌ベクター pBluescript II を大腸菌 JM 109 と海洋細菌 SC9 とに導入した場合には、pBluescript II は JM 109 中では発現したが、SC9 中では発現しなかった。本結果は海洋微生物には独自のベクターが必要であり、大腸菌用のベクターでは機能しない場合のあることを示唆している。

以上の結果から、組換え体プラスミド pMAF1 は大腸菌内でも海洋細菌内でも発現するシャトルベクターであることがわかった。

### 5. プラスミド pTS1 の複製起点領域の特定

前述のように、pTS1 の ori は特異的な配列で構成されているため、ホモロジー検索では、その領域を特定することができなかった。そこで、本研究では、ディレーション法と接合伝達法を用いて、pTS1 の ori 領域を特定

することにした。

組換え体プラスミド pMAF1 を normal 側と reverse 側からそれぞれディレーションし、種々の大きさのサブクローンを作製した。そして大きさが約 250 ~ 300 bp ずつ異なったサブクローンをそれぞれ約 30 種スクリーニングし、海洋細菌 SC9 へ順次導入した。この結果、ある大きさからは導入したサブクローンが機能しなくなったので、このデータをもとにして pTS1 の ori 領域を特定することができた。pTS1 の ori は *EcoR* II-*Pvu* I 断片上、*Pst* I サイトから下流 211 ~ 1757 pb の領域に位置していた (図 5)。

### 6. おわりに

本研究の結果から、pMAF1 は大腸菌と海洋細菌のいずれにも発現するシャトルベクター機能を有していることが判明した。海洋細菌のプラスミドに関する研究はまだまだ少なく、pMAF1 が開発されたことで、将来増養殖の生産効率を高める有用微生物飼料の作出も夢ではなくなった。また、ベクター pMAF1 を導入した海洋微生物 SC9 は、魚介類の消化管より分離された菌であり、飼料ともなる。この菌に新しい遺伝子を導入すると、本菌が魚介類の消化管中に生息し有用物質を生産するため、魚介類の成長や耐病性の促進効果が得られるものと期待している。

(*Pst* I サイト)

```

1 CTGCAGGATT GGGTATCACA GCAGGCCATT GATCAAACA ACAAGGCCAT GAGTGAAC TA GAAGAAAAGC ACCGCCAGA AATGAAAGAA CTTGAGCAAG
101 AGTTCGAAAA GCTCAAAGAT ATGATCTAAA AAATACCCCTA TCCAATAAAA ACAATAAACCC GCCCCTAAAT ACTGGCCCTT TAATATACGG GGCCITTTTT
201 TGTITGTCCC TGGAAAGTGCA AACAAGGCAG GCCACCGAAC CAAGGCAGGC CACTGCATCG AATTGTTTAA GTAGTTATCA AAATGATTCT GGCCATCGCA
301 TCAAGGCAGG CCACCGAACC AAGGCAGGCC ACTGCATCGA ATTGTTTAA GAGTTATCAA AATGATTTCG GCCACCAAC CAAGGCAGAC CACTGCATCG
401 AGTCAGTATG TCATTTCTGT AGTTCGGTAA CTAGAGTGT ATTTATTAAT TTTGGACAAT AGTAATCATA TGACCCGGCTC TTGCATGGCA ACAAGAAAAC
501 CGAGCTTGCG AGGTGGCGTA GTTTAATTGG TTGGGTTAAA GCATTTGGTGT GGTAAAGTGC TAGAATGCTG AAATATCAG GCGTCGATT TCACTAGCTG
601 ACCAAACTAT AAGGGCACT ATTTATTAAT CCGAGTGCCA AACCATGCAA GATAAACCTG TTTTCATACC GTTCGAGCCG TTCTAAGCTC GCAGGATTC
701 AGTGTGTTAG TTAATTTTAT GTCGTTTAA TTTATAAAAT GCCGTGACAT AAGCGTACAT TTTGCACTAG AATCAACTTA CCACAGTTGT TTGTCCTAGT
801 GCCTAACCGC CTAACATAC ATGAAGAAA CCGCTCTAG CAATAGAAGC GGCITTTTTT CGTTTAAAAA TCATCAATTT CCGATGATT AATTTAATGC
901 GATCAATTTA AGCAGCACTT AATTTTCTAA CCTCTCCGCT ATAAGTAAAT CATCGCTAGG CAATACCTGA TCTTTTTGCG ATAGCTCTAA CACTGTTTGG
1001 GGTGAATGGC CCACGTTCTG AAGATAGCC TTTTTCGTTT AACCAAGATG ATGCTGCTT ATAGTCCAAA CCTCTATTGT AGCAATCAGC AATTAATGCA
1101 ATTCGTTCTT CTCTAGTGGT TCGCTTGCCT GCGATTTTAG TCTCATTAGA TACTACAGGA CCGCCATGTA CTGTTTCCAG CGCAGTGGGT GTCGGTGTTC
1201 GTCTCTCTCT CAATCGGCTG AATTACAGCG CGCTTAATCC ATGCTGAACG AGGGACGTC CCGCCAGGG AGTCAACGAC AGCAAGCATT TCATGGGTAA
1301 TTCGTATGTT TGTATTAAC TATTGTTGT TGGTGTAGA CATTGTAATT AACCGATGTT AGGTAAGTGA GATCAACAAA TATTACAGTA AAGCAAGAAG
1401 TGTCAAAACC AATAGAGTTA CCTGTTGACT GATATTGTAG CTACATATAT GTTATGATAG TACGGATAAT ATGGAGTAAA AACATGGCT AAACAGCTTT
1501 ACCGATTTCAG AATTGAACCC GAGCTACTGG AAGAATTTAA GAGATATGCA GATGAGTGTG ATCTTGCACT CAGTGAAGTA ATTCGTTCTG CAATCAAGAA
1601 CGAAATCACC GAATAACAGA CATTAAAAA CCTAGTGAC TCITCGACCT TTCACTAGGG TTCAGCCAAT AGCTAATTAG GAGCTACCGA CATGCAAACT
1701 TTAACAACCTC CCAACTGCT ACGCATAGCA ATTCATTTAA CCCCAGGACA GTTCGATTCG CTTTTAAACA AAGTCAGGCG TTAATCATGG AACTAACACT
1801 ACAACAACGC ATAGCAAAGG CTCGTTCTGA GCTTATCAC CACGCTGTGG AGAAGAAAAG CAATACGAAG CTACCCGTTT ATAAGAAAAG CGACCAACAG
1901 CGCATAGAAG CGGCATAGG CTCAAAATTA GATAGCAGCT ACTTGCTGTG GTTTAAGGTA TCTGTACAAA CTGGATGGAG AACTACAGAC GTTTGCGAAC

```

ori

図 5 特定した pTS1 の ori 領域

文 献

- 1) 符 勇・吉枝 恵・前田昌調 (1993) 平成5年度日本水産学会秋季大会講要, p.76
- 2) 符 勇・荒木和男・前田昌調 (1993) 平成5年度日本水産学会秋季大会講要, p.77
- 3) 符 勇・前田昌調 (1994) 平成6年度日本

水産学会秋季大会講要, p.128

- 4) Yoshieda, M., I. Nakayama and M. Maeda (1995) *Fish. Sic.*, 61 : 898-903
- 5) Tonomura, K., T. Okamoto, M. Yasui and H. Yanase (1986) *Agric. Biol. Chem.*, 50 : 805-808

地域先端研究

## ニンニクウイルスフリー化後の研究の展開

青森県グリーンバイオセンター

鈴木 正彦・庭田 英子・山下 一夫・長谷川 一

ニンニクウイルスフリー株の作出や供給に関連して、茎頂の安定した超低温保存法やニンニクに感染するウイルスの同定が行われた。超低温保存では非常に高い再生率を示す条件を確立し、またウイルスフリー株の再感染を調べているうちに新しいウイルスが見つかった。さらに、ソマクローナル・バリエーションを行うためのプロトプラストの再生条件が調べられ、形質転換にも適用されつつある。

### 1. はじめに

ニンニクは栄養繁殖性作物でウイルスによる収量減少が顕著に見られる。種子で増える作物では種子が形成されるときにウイルスが除去されるといわれるが、いも類、球根類などの栄養繁殖性作物では株分けで増えるためウイルスが代々伝わり、大きな被害をもたらす。またウイルスには効果的な薬剤がなく、ウイルスが発生したときは病徴が見られる罹病植物を除去するなど蔓延を防ぐ方法しかないのが実状である。そこでウイルスフリー株の作出が重要になってくる。

青森県ではウイルスフリー株作出の試みがイチゴ、ニンニク、ナガイモ、リンゴ、ラッキョウ、セリなどについて既に行われており、特産のニンニク(生産量全国一)については1982年から生産段階に供給されている。その後、ニンニクウイルスフリー株の供給にあたり、ウイルスフリー株の増殖・保存法や再感

染など幾つかの問題が生じてきた。ここでは、それらの問題に関連してニンニクの超低温保存やニンニクのウイルスの同定、ニンニク・プロトプラストの再生条件などについて述べることにする。

### 2. ニンニク茎頂の超低温保存

ニンニクは、ほとんどの栽培品種が不稔であり、種子を形成しない。

夏の高温期には葉や根が枯死し、地表面の直下に形成された鱗茎が休眠して過ごす。この鱗茎が掘上げられて農業生産物となり、一部が子孫を増やすために休眠の覚醒する秋まで貯蔵される。しかし、最も長期間保存可能な鱗茎でさえ、普通、数か月の保存にしか耐えられず、その生殖体は、従来、ほ場で栽培を繰り返すことにより保存されていた。これでは、試験材料が一定の時期にしか入手できない。ウイルスフリー株の長期的保存や遺伝的に安定した実験材料の保存のために、また遺伝資源の継続栽培の場合に起こりうる気象災害や病害虫等による消失の危険性を補うた

SUZUKI Masahiko, NIWATA Eiko,  
YAMASHITA Kazuo, HASEGAWA Hajime

表1 前培養日数が超低温保存後の茎頂の生存率に及ぼす影響

前培養日数 (日間)	植物体再生率 (%)	
	ガラス化剤処理不凍結	-196°C まで冷却
0	100	30±6.0
1	100	80±10.6
2	100	100
3	100	100
5	100	100
8	100	100

品種:「福地ホワイト」, 前培養:20°C, 12時間照明  
めにもう一つの保存方法として, 超低温保存法を試みた。

北海道大学の酒井ら<sup>1)</sup>によって, 植物体が微生物や動物の精子などのように液体窒素によって長期保存できることが報告されて以来, 超低温保存は多くの植物に適用されている。その手順は(1)低温に対する抵抗性が高い材料, または, 抵抗性を高めた材料を用い, (2)化学的または物理的に適度に脱水し, (3)液体窒素中に保存し, (4)これを室温まで昇温させ, (5)脱水のために用いた凍結保護剤を除去し, (6)生長を促す培地に移植する, といった一連の流れである。

ニンニクの場合, 保存する茎頂は栄養生長期の鱗茎(夏期の休眠が覚醒後から低温を感受する前)から取り出す。茎頂は基盤部0.5 mmと葉原基3~4枚をつけた状態で用いる。このままでは超低温保存効率が安定しないが, ムラシゲ・スクーグ(MS)培地上で, 20°Cで2日間以上培養すると, 高い生存率が得られるようになる(表1)<sup>2)</sup>。「福地ホワイト」では材料の大きさは2mmに達し, 2日間の前培養で充分であるが, 生長点が小さい品種や個体では培養期間を長くして, 大きさが約2mm程度になった状態で超低温保存しなければならない。

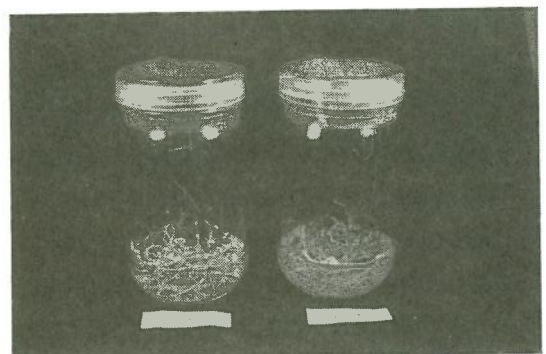
液体窒素挿入直前の脱水処理は植物の種や組織によって適当な方法を採用が, ニンニク茎頂の場合は最も簡便な方法であるガラス化法で高率に生存可能で, 昇温後の再生状態も良い。前培養した茎頂をねじ蓋付きの硬質ガラス製またはプラスチック製の凍結保存容器に入れ, ガラス化液に室温で5~15分間浸漬して脱水させる。そして速やかに液体窒素の

温度まで冷却し保存する。超低温での保存後の再生率は1年6か月後まで調査され, 全ての茎頂が順調に生長するのが確かめられた。

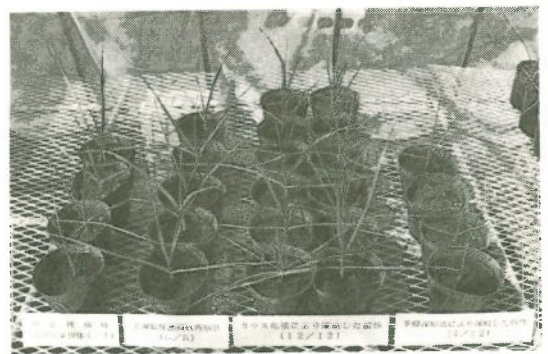
保存後に植物体を回復させるには, 30°C温湯で速やかに昇温後, ガラス化剤を希釈し, ジベレリン(GA<sub>3</sub>, 0.5mg/l)を添加した培地で培養する<sup>3)</sup>。超低温保存された茎頂はいったん退色したのち1週間程で緑色が回復し, 生長する。この再生培地では, 生長点に傷害がない場合, 1個の生長点から1個の植物体



ニンニク茎頂の処理30日目(左から1列目;無処理, 2列目;凍結保護剤処理不凍結, 3~4列目;予備凍結法による超低温保存, 5~6列目;ガラス化法による超低温保存)



ガラス化法による超低温保存後3か月の植物体(左;不凍結, 右;超低温保存)



ガラス化法による超低温保存後6か月の植物体(左から1列目;無処理, 2列目;凍結保護剤処理不凍結, 3~4列目;ガラス化法による超低温保存, 5列目;予備凍結法による超低温保存)

図1 -196°Cまで冷却された, または冷却されなかった茎頂からの植物体再生

表2 超低温保存後の再生率における品種間差

品 種	前培養日数 (日)	再 生 率 (%)
(日本)		
福地ホワイト	2~3	100
壱州早生	14	87.5
石川六片	4	80.0
佐賀在来	4	97.0
遠州極早生	7	84.5
鹿児島在来	9	86.3
(中国)		
阿 城	3	100*
上 海	13	100*
香 港 白	5	80*
台 中 軟 骨	5	71.3
山 東	3	100*
九 竜 桃 色	14	92.3

1区10個, 2~3反復, 但し, \*印は反復なし

が直接的に発生するが, 保存後の茎頂から複数のシュートが発生することもあり, この場合は何らかの傷害が発生しているものと推測される。再生した植物体は馴化, 鉢上げされ, 現在はほ場で順調に生育している (図1)。

この方法により12品種の再生率を調査したところ, 「福地ホワイト」「阿城」「上海」および「九竜桃色」で100%, 「台中軟骨」では71.3%であり<sup>2)</sup> (表2), 保存方法として充分活用できるものと考えられる。このようにして, 茎頂が保存できるようになり, 必要なときに材料が入手できるようになった。

### 3. ニンニクモザイク病の病原ウイルス

ニンニクは栄養繁殖性植物であることから, 栽培されるほとんどのニンニクはウイルスに感染し, モザイク症状を呈する。日本でのニンニクモザイク病の研究は佐賀大学の佐古<sup>4)</sup>による Potyvirus グループに属するひも状ウイルスの報告が最初である。佐古はこのウイルスをニンニクモザイクウイルス (Garlic mosaic virus: GMV) と命名した。その後, 大阪府立大学のグループによって Carlavirus に属するニンニクのウイルスが見つかり, ニンニク潜在ウイルス (Garlic latent virus: GLV) と命名された<sup>5)</sup>。

青森県では1990年頃, 網室栽培のウイルスフリー苗でモザイク病が大発生し大きな問題



図2 ニンニクダニ伝染モザイクウイルスのウイルス粒子

となった。それとほぼ同時期に, チューリップサビダニ (以後サビダニと略す) の発生が県内各産地で確認された。モザイク病の再感染株を調査したところ, サビダニの吸汁と再感染との間に深い関係が認められた。そこで, サビダニによるモザイク病の伝搬試験を行った結果, ウイルスの伝搬を確認した。ダニ伝染性ウイルスの接種試験や血清学的関係, 細胞内所見などから, 本ウイルスは未報告のウイルスと考えられたので, ニンニクダニ伝染モザイクウイルス (Garlic mite-borne mosaic virus: GMbMV, 図2) と称することを提案した (山下<sup>6)</sup>, 1993)。ウイルス遺伝子の3'末端領域の塩基配列とアミノ酸配列を決定したところ, このウイルスと遺伝子構造が一致するウイルスグループがないことが明らかになった。ただ, Onion mite-borne latent virus (OMbLV)<sup>7)</sup>との異同についてはまだ調べていないので検討する必要がある。



図3 リーキイエローストライプウイルス抗血清と反応するひも状のウイルス粒子

一方、ニンニクモザイク病については古くからアブラムシによって伝染することが知られていた。しかし、その正体は判然としていなかったため、そのウイルスを分離・同定したところ、リーキイエローストライプウイルス (Leek yellow stripe virus: LYSV, 図3) であることがわかった<sup>8)</sup>。一方、海外ではネギ萎縮ウイルス (Onion yellow dwarf virus: OYDV)<sup>9)</sup> もニンニクモザイク病の病原ウイルスとされているが、日本での報告はまだないので今後OYDVの発生の有無を確認する必要がある。

#### 4. ニンニク・プロトプラストの再生

ウイルスに強いニンニクの品種をソマクローナル・バリエーションで作出したり、遺伝子操作によってウイルス抵抗性を付与する基礎として安定したニンニクプロトプラスト系の作出と再分化系が必要である。ニンニク・プロトプラストからの再生は綾部ら<sup>10)</sup>によって報告されているが、より効率的な再生系を検討したところ、次ぎの手順が有効であった。

生長点に葉原基を1枚つけた大きさを摘出した茎頂組織を、ベンジルアデニン (BA) 0.2mg/l, ナフタレン酢酸 (NAA) 0.02 mg/l, 2%ショ糖を含む1/2リンスマイヤー・スクーグ (LS) の液体培地で2か月間回転培養し、緑色の苗条原基様細胞塊を得る。

表3 ニンニク・プロトプラストのコロニー形成における培地間差

基本培地	低濃度ホルモン		高濃度ホルモン	
	初期分裂	コロニー形成	初期分裂	コロニー形成
1/2 MS	17	0	171	55
MS	5	0	193	50
1/2 LS	39	0	242	45
LS	4	0	190	45
1/2 B5	3	0	112	14
B5	7	0	170	12

(単位: 個)

包埋: 1.2%アガロース+0.55Mマニトール  
 培養密度:  $5 \times 10^5$  個/ml  
 低濃度ホルモン: BA 0.1mg+NAA 0.1mg  
 高濃度ホルモン: BA 1mg+NAA 1mg  
 初期分裂: 培養21日後の視野当たり形成数  
 コロニー形成: ビーズ当たり形成数

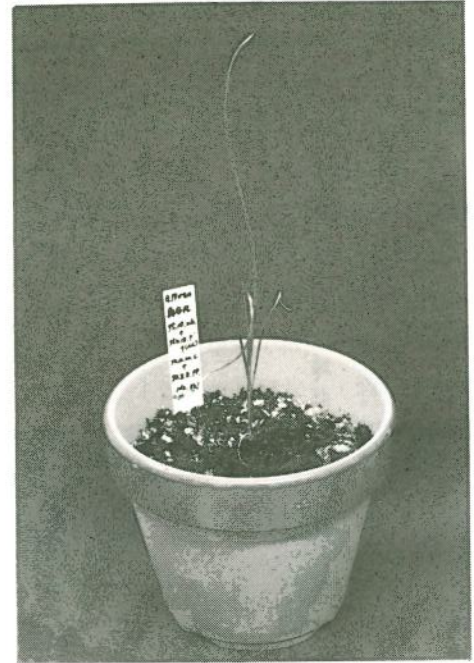


図4 ニンニク・プロトプラストからの再生植物

それを2, 4-D 1 mg/l, 3%ショ糖を含むMS寒天培地に移植して増殖した粒状の黄色カルスからプロトプラストを単離した。プロトプラストの単離は0.2%ペクトリアーゼ, 2%セルラーゼ・オノズカRSを含む酵素液で行った。得られたプロトプラストは $5 \times 10^5$ /mlの密度で0.6%アガロースで包埋し培養した。

初代培地にはBA 1mg/l, NAA 1mg/l, 0.55Mマニトール, 1%ショ糖を含む1/2MS培地を用いて行い, 培養40日後に浸透圧を0.3Mマニトールに下げた。プロトプラストの培地はMS培地がLS, B5培地よりも適していた(表3)。増殖培地(BA 0.02mg/l, NAA 2 mg/l, 3%ショ糖を含むLS培地)でカルスを増やしたのち, 再分化培地(BA 2 mg/l, NAA 0.02mg/l, 3%ショ糖を含むMS培地)に移植して不定芽を誘導し, シュートを形成させた。2~3 cmに伸びたシュートを発根培地(3%ショ糖を含むホルモンフリーのLS培地)に移植し, 根を充分伸ばした後にバーミキュライトを入れたイチゴパックに移して馴化した。その後, ポットに鉢上げして再分化植物体を得た(図4)。

## 5. おわりに

ニンニクは単子葉植物であるため、アグロバクテリウムによる感染は難しいとされているが、今回得られたプロトプラストは形質転換の良い材料になると思われる。現在、形質転換の試みを行っていると同時に、主要なニンニクのウイルスの塩基配列を調べ遺伝子操作によるウイルス抵抗性の作出を目指して研究を行っている。

なお、ニンニクの超低温保存は青森県畑作園芸試験場との共同研究であり、ニンニクのウイルスの同定は農水省九州農業試験場の花田室長らとの共同研究である。

## 文 献

- 1) Sakai, A. (1960) *Nature*, 185 : 393-396
- 2) Niwata, E. (1995) *Cryo-letters*, 16 : 102-107
- 3) 庭田英子 (1995) 青森県畑作園芸試験場研報, 8 : 7-16
- 4) 佐古宣道 (1976) 日植病報 42 : 383
- 5) 李龍雨・山崎昇三・尾崎武司・井上忠男 (1979) 日植病報 45 : 727-734
- 6) 山下一夫 (1993) 日植病報 59 : 57
- 7) Van Dijk, P., M. Verbeek and L. Bos (1991) *Neth. J. Pl. Path.* 97 : 381-399
- 8) 山下一夫・酒井淳一・花田薫 (1995) 日植病報 61 : 273
- 9) Van Dijk, P. (1993) *Neth. J. Pl. Path.*, 99 (Sup. 2) : 1-48
- 10) 綾部昌則・角慎一郎 (1991) 第12回植物組織培養学会シンポジウム講演要旨集, p.76



## 文献情報

花芽分化を誘導する  
遺伝子スイッチ

アラビドプシスは植物の大腸菌と呼ばれ、ゲノムサイズが小さいことや1世代に要する時間が短いことなどの利点から多くの分子遺伝学レベルの研究の対象となっている。それらの研究の中から、花の形態形成に関わるABCモデルが提唱され、それがアラビドプシスに限らずペチュニアやキンギョソウなどの他の植物にも適合することが明らかにされている。一方で、植物がそのライフサイクルの中で栄養生長期から生殖生長期へとステージを変化させ、頂部分裂組織で花芽分化が起こる過程でどのような遺伝子が関与しているのかについても、様々な変異体を用いた実験で次第に明らかになってきている。これまでに、*LEAFY* (*LFY*), *APETALA1* (*API*), *CAULIFLOWER* (*CAL*) 等の遺伝子が分化の初期の段階で機能することが推定されていたが、相互にその機能が重複していたり複雑な発現調節が行われていることが予想され、個々の機能については明らかになっていなかった。

Wiegel & Nilsson および Mandel & Yanofsky は、それぞれ *LFY*, *API* の機能を明らかにするために CaMV の35S プロモーター下流に個々の遺伝子を挿入し、アラビドプシスを形質転換して ectopic に発現する *LFY*, *API* の影響を調べた。得られた形質転換体は、*LFY*, *API* いずれの場合でもその表現型は極めて類似していた。すなわち、通常は総状花序となる一次シュートの頂端に早い時期に花芽の形成が誘導され、極端な場合には一次シュートが全く伸長せずに着花する場合もあった。また葉腋部から分枝する二次シュートも単一花へと分化した。*LFY* では、多年生樹木である aspen (*Populus tremula* × *tremuloides*) を同様に形質転換したところ、通常は花芽を形成するまでに8〜

20年を要するのに対して、再分化した aspen ではアラビドプシスと同じく一次シュートの頂端が花芽へと分化し、また葉腋部にも花芽が形成された。以上の結果から、*LFY*, *API* いずれも単独で花芽分化を誘導する能力があることが明らかになった。またこれらの形質転換体の表現型は *TERMINAL FLOWER* (*TFY*) と呼ばれる遺伝子の変異体と類似していた。

アラビドプシスの野性型では、長日条件下で花芽形成が促進されるが、短日下でもいずれは花芽分化が起こる。短日条件下で花芽形成までに抽出するロゼッタ葉の数は、その栄養生長期の長さ按比例して多くなり、長日条件下での10枚程度に対して、短日条件下では35枚ものロゼッタ葉が形成される。*LFY*, *API* の形質転換アラビドプシスでは、長日条件下および短日条件下で生長した野性型の中間型の形質を示した。すなわち、形成されるロゼッタ葉の数は19枚となり、長日条件下では極端に短くなった一次シュートも、比較的長くまで伸長した。このことは *LFY* および *API* の構成的な発現による影響が短日条件下では弱められたことを意味しており、逆に言えば *LFY* や *API* の花芽分化誘導能がそれだけ大きいとも言える。いずれにしろ開花時期を早めることができれば、農業上重要な作物の育種を行ううえで、その期間が短縮されるなどの重要な進歩が得られるに違いない。

それでは、*LFY* と *API* はどちらが上流の遺伝子として機能しているのだろうか。これまでの分子遺伝学的知見から、*ap1*, *cal* の二重劣性変異体では *LFY* の RNA 発現量が低下することや、*API* の発現が *lfy* では遅れることが知られていた。また *lfy* 変異体では必ず少なくとも2〜3個の花がシュート化する一方で、その他の遺伝子の変異体では必ずしもシュート化が起きなかったことから、*LFY* の影響が最も強いものと予想されていた。*LFY* 形質転換体を *ap1* 変異体と交配して得られる後代では、親の中間の形質を示した。すなわち、一次シュートは頂端に花芽を



つけるが比較的良好に伸長し、また葉腋部からは二次シュートが形成された。一方で、API 形質転換体を *lfy* と交配した場合には、API 形質転換体とほぼ同様の後代が得られたが、花の構造に関しては *lfy* 変異体と同じく花弁や雄ずいを欠くものが得られた。これらの結果は、分裂組織の分化の方向を決定するうえで *LFY* は API の上流に位置し、*LFY* の役割の 1 つは API を活性化することであることを示唆している。また *LFY* と API がともに正の方向で花芽分化に協調して働いていることも明らかとなった。

API は、形態形成の段階でも ABC モデルに適合した発現様式を示し、*whorl1* に相当する萼や花弁の形成に関与していることが知られている。本稿で述べた花芽の分化の誘導と形態形成との関係が明らかにされることで、花芽形成に至る頂端分裂組織の複雑な制御システムが解明されると期待される。また *CAL* などのその他の分化誘導に関わる遺伝子との関連についても興味を持たれる。

(抄訳 柄澤 明—東北大農)

(KARASAWA Akira)

#### A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants

Weigel, D. and O. Nilsson

*Nature*, 377 : 495, Oct. 12 1995

#### A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*

Mandel, M. A. and M. F. Yanofsky

*Nature*, 377 : 522, Oct. 12 1995

#### 文献情報

### 真核生物における保存された イニシエータタンパク

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の細胞は細胞質と核が核膜で分離された真核生物であり、高等動物の細胞と共通性が極めて高いことより、真核生物を代表するものとして研究され、真核細胞の一般的モデル系として

の地位を獲得している。解析に用いることのできる分子遺伝学的技法の多様さ、精密さという点において酵母は他の真核生物材料を大きく引き離している。

真核細胞の DNA の複製開始機構に関する研究において、酵母はまさにその中心的な存在であり、酵母により明らかとなった機構およびそこで得られた分子レベルでの情報は、そのまま高等動物細胞での機構および遺伝情報の解析の手がかりとして用いられている。

さて、DNA の複製開始に関して、「DNA の複製が開始するには、染色体上の特異な複製配列を認識するイニシエータタンパクが必要である」というモデルが現在考えられている。このモデルによると、イニシエータタンパクによるレプリケーター (複製開始染色体座) の認識が、DNA の複製起点の位置を決定する。しかし、真核生物において、このイニシエータタンパクや複製開始に関わる成分はいまだ明確とはなっておらず、DNA 複製起点を明らかにしようとする試みはほとんど失敗に終わっている。唯一の例外が酵母であり、これらの解析が酵母において分子レベルで進んでいる。

酵母では自立複製のために必要な配列 (Autonomously replicating sequences (ARS)) の存在と、その ARS は、必須の ARS 共通配列 (ACS) と他のエレメントよりなっていることがすでに明らかとなっている。そこで、ATP 依存下で ACS を認識し結合するという能力をもとに、DNA の複製開始をつかさどる起点認識複合体 (origin recognition complex (ORC)) が分離された。この ORC はレプリケーターの中にある 2 つの配列を認識し、細胞周期中を通じ DNA に結合している。そして、他の細胞周期関与タンパクと協同して酵母染色体の複製開始を決定しているものと考えられる。

酵母 ORC は約 50 から 120 kDa の 6 個のポリペプチド・サブユニットよりなる複合タンパクである。これらのサブユニットをコードする遺伝子はすべて酵母の生存に必須であり、またこれらの遺伝子 (ORC1 から ORC6) は

いずれも新規なタンパクをコードするものであった。

ORC1はORCのなかで最も大きなサブユニットをコードするが、これは既知の2つの酵母タンパクと相同性を有していた。その相同タンパクの一つが、G<sub>2</sub>期からM期への移行を制御しDNA複製の開始に関わる調整因子Cdc6pである。Orc1pとCdc6pの全配列の中では、核酸への結合に関与すると考えられる部位(CDC-NTP domain)で最も相同性が高く、酵母*Kluyveromyces lactis*におけるkIOrc1pともその部分で最も相同性が高かった。そこでこの部分の配列をプローブとして利用することで分裂酵母*S. pombe*、さらにRT-PCR法によりhumanのRNAから、それぞれORC1関連遺伝子を取得することができた。同様に、酵母Orc2の配列情報をもとに、*Arabidopsis thaliana*、*Caenorhabditis elegans*さらにhumanのORC2関連遺伝子を取得した。

酵母*S. cerevisiae*のOrc1pおよびOrc2pは*in vivo*で他の4つのサブユニットと相互作用し、機能を持った複合体を形成することが確認されているが、同じくhumanのOrc1pおよびOrc2pも*in vivo*で複合体の一部を形成することが確かめられた。

今回、酵母のDNA複製開始起点認識複合体(ORC)の2つのサブユニットの配列情報をもとに、異なる真核生物より関連遺伝子を取得し、これら2つのORCが真核生物で高い保存性を有していることが示された。それゆえ他のサブユニットにおいても同じような高い保存性があり、それらが形成する複合体は、脊椎動物をも含む真核生物において、酵母と同様な機構でDNA複製開始の制御に関わっていることが推察される。

(抄訳 家藤治幸—国税庁醸造研究所)

(IEFUJI Haruyuki)

### Conserved initiator proteins in eukaryotes

Gavin, K. A., M. Hidaka and B. Stillman  
*Science*, 270: 1667-1671 (1995)

### 文献情報

## コンドロイチン硫酸は「ジキル博士とハイド氏」か？ —アテローム性動脈硬化発症との関係—

最近、糖鎖科学(glycoscience)や糖鎖生物学(glycobiology)、糖鎖工学(glycotechnology)という言葉が生まれるほどに、糖鎖に注目が集まっている。プロテオグリカン(PG)の糖鎖であるグリコサミノグリカン(GAG)の研究も活発化している。生理活性のあるGAGの代表例として、1916年にMcLeanによって抗血液凝固物質として発見され、長年、医薬品として汎用されているヘパリンをあげることができる。最近、ヘパリン様分子のヘパラン硫酸が生体内で線維芽細胞成長因子と結合することによって、その活性を調整し、細胞増殖制御にかかわっていることが発見され、注目を集めている。

それにくらべると、日本ではヘパリンと同様に古くから医薬品として利用されているにもかかわらず、コンドロイチン硫酸(CS)に対する注目度は低い。それは、①CSがヘパリンのような強い生理活性をもたない、②発見されている生理活性の多くは、CSにコアタンパク質が結合したコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)に関するものであり、CS単独では活性をもたない場合が多い、③CSを除去したコアタンパク質にも活性がある、つまり、活性本体がコアタンパク質であることも多い、などの理由によると思われる。

CSが活性の中心的な役割を担うことがまったくないわけではない。数少ない例のひとつとして、低密度リポタンパク質(LDL)とCSPGの結合をあげることができる。CSPGのLDL結合親和性の本体がCSにあるという報告があるのである。また、①アテローム性動脈硬化発症部位でCSPGの増加とリポタンパク質(特に、LDL)の沈着がみられる、②LDL-CSPG複合体がアテローム性動脈硬化発症部位で形成される、③

LDL-CSPG 複合体がアテローム性動脈硬化発症部位に特徴的な泡沫細胞の形成原因となる  $M\phi$  へのコレステロールエステル (CHE) 蓄積を促進する、という報告もある。つまり、動脈壁 CSPG と LDL の結合 (CS と LDL の結合) が、アテローム性動脈硬化発症の原因の一つである可能性が指摘されているのである。

ここでは「動脈壁 CSPG バリエントの LDL 結合親和性が  $M\phi$  への CHE 蓄積を調節する」と題した Srinivasan らの文献を紹介したい。Srinivasan らは、① LDL 結合性の異なる 2 種のパーシカン型の動脈組織 CSPG モノマーの性質、② 2 種のバリエントが  $M\phi$  の LDL 代謝を調節する活性を調べた。

解離条件下でウシ大動脈内膜-中膜からデルマタン硫酸 (DS) を含まない大型 CSPG を分離・精製した。さらに、その CSPG を LDL アフィニティクロマトグラフィで CSPG I と CSPG II の 2 種のバリエントに分画した。CSPG I は 0.1M NaCl, CSPG II は 1.0M NaCl で溶出した画分である。2 種のバリエントのコアタンパク質の分子量は同一 ( $1.7 \times 10^5$ ) で、アミノ酸組成にも有意差はなかった。しかし、CSPG II は、CSPG I より大きな平均分子量 (II :  $4.2 \times 10^4$ , I :  $3.8 \times 10^4$ ) の CS を数多く (II : 30本, I : 25本) もっていた。さらに、CSPG II の CS のコンドロイチン 6-硫酸 (C6S) のコンドロイチン 4-硫酸 (C4S) に対する比率は、CSPG I のものよりも高かった (C6S : C4S ; II : 65 : 35, I : 52 : 48)。CS の硫酸基とヘキサミンのモル比は共に約 1 で、有意差はなかった。

LDL-CSPG I 複合体 (以下、複合体 I) と CSPG II (以下、複合体 II) は共に LDL 単独よりも、 $M\phi$  の LDL 分解、 $M\phi$  と LDL の結合および  $M\phi$  の CHE 合成を促進する活性が高かった。しかも、すべてにおいて、複合体 II のほうが複合体 I よりも促進活性が高かった (以下、LDL 単独に対する値。LDL 分解促進 ; 複合体 II : 10.3 倍, 複合体 I : 8.4 倍, LDL 結合促進 ; 複合体 II : 16.3

倍, 複合体 I : 10.2 倍, CHE 合成促進 ; 複合体 II : 8.4 倍, 複合体 I : 6.4 倍.)。CSPG II の促進活性は、通常の CS/DSPG アグリゲイト (PG, ヒアルロン酸, リンクタンパク質からなる複合体) と同程度であった。

Srinivasan らの報告をまとめてみる。コアタンパク質が同一で、CS の硫酸化度が同じであっても、分子量が大きく、C6S 構造が多い CS を数多くもつ CSPG が、より高い LDL 結合親和性をもち、動脈壁へのコレステロール (CH) 沈着を促進する活性が高い。その LDL-CSPG 複合体は  $M\phi$  によって取り込まれやすく、それを取り込んだ  $M\phi$  はより多くの CHE を合成、蓄積する。

CHE を蓄積した  $M\phi$  は泡沫細胞化し、さらに動脈壁への CH 沈着が促進される。動脈壁への CH 沈着の増加はアテローム (粥腫) 形成の促進要因である。CSPG の LDL 結合親和性の変化 (=CS の質的量的な変化) が、 $M\phi$  への CHE 蓄積の調節を介して、アテローム形成 (=アテローム性動脈硬化発症) に関与している可能性が高いのである。

Srinivasan らの報告や他の報告から考えて、どうやら CS はアテローム性動脈硬化発症に関与しているようである。しかし、CS は細胞外マトリックス成分のひとつとして動脈壁に必要な構成成分でもある。

CS は、スティーブソン原作の小説「ジキル博士とハイド氏」の主人公のように、普段は善玉であるが、時としてなんらかの理由で悪玉に変身し、アテローム性動脈硬化発症に関与するのであろう。

(抄訳 八塚信明-マルハ榊)

(YATSUKA Nobuaki)

#### Low-density lipoprotein binding affinity of arterial chondroitin sulfate proteoglycan variants modulates cholesteryl ester accumulation in macrophages

Srinivasan, S.R., Ji-Hua Xu, P. Vijayagopal, B. Radhakrishnamurthy and G.S. Berenson  
*Biochim. Biophys. Acta*, 1272 : 61-67 (1995)

海外便り

## ロサンゼルスでのコロナウイルス遺伝子に関する研究

農林水産省 家畜衛生試験場

塚本 健司

### はじめに

人口1,200万人のロサンゼルスに私が到着したのは1993年10月の比較的暑い日でした。都市全体をスモッグが層を成して覆っているのが空港から見え、なんて汚い都市だと幻滅したのを覚えています。ロスには、ハリウッドやビバリーヒルズといった華やかな一面と、暴動・殺人・カージャックといった残虐な都市型犯罪のメッカとしての一面があります。これらは、単一民族である私たち日本人には理解し難いことですが、たぶん、言語、価値観、教育水準、財産が大きく異なる、幾多の人種が、相互理解できないままに共同生活していることからくるのでしょう。白人系、東洋系、メキシコ系、アフリカ系の移民に加え、多くの不法滞在者が社会を更に複雑なものにしています。事実、私の到着1年前にはロス暴動が、到着1か月後には高級住宅地の放火事件、そしてノースリッジ地震、カージャックによる日本人殺人と、次々に生活基盤を脅かす事件が連発し、渡米直後は、家族を伴った滞在にかなり不安を覚えました。

### コロナウイルス感染症研究の重要性

さて、そんなロスで私が選んだ研究室は、南カリフォルニア大学医学校の分子微生物学部の研究室で、権威ある Howard Hughes Medical Instituteでもあり、教授は Virology の Editor として活躍していました。1980年代のコロナウイルスの分子生物学的研究は彼

TSUKAMOTO Kenji

の研究室で最も進みました。一方、畜産分野にはコロナウイルスによる経済損耗の著しい疾病が多く、小牛の下痢症、子豚の伝染性胃腸炎、鶏の伝染性気管支炎 (IB) などはその代表です。私の興味は IB で、鶏に呼吸器症状、発育不良、産卵低下、卵質低下を引き起こします。このウイルスには抗原性状の異なる野外株が多数存在するため、ワクチンによる制御が難しいのですが、これは野外で抗原変異 (Point mutation) が高率に起きているからと考えられています。そして、野外株の塩基配列を調べてみると、遺伝子上のある一点を境に別のウイルスの塩基配列に置き換わっていることが報告され、野外でウイルス株間の遺伝子組換え (Recombination) が起きていることが示唆されました。変異を起こしやすく、ワクチンによる予防が難しいと言う点はインフルエンザウイルスとよく似ています。更に、確認が必要でしょうが、ウイルスが鶏体内で持続感染すると報告されています。若い鶏にウイルスが感染すると、一旦は体内で増殖したウイルスが、免疫が成立すると体内から排除され、回収されなくなります。ところが、成長し産卵を開始する頃になると、再びウイルスが回収されるのです。これが事実とすれば、大変ショッキングです。養鶏場では、この産卵開始直前に産卵期の免疫を補強する意味で生ワクチンが投与されていますが、もし鶏が野外株の放出を再開していれば、ワクチン株との間で容易に組換えウイルスが作られるからです。この仮説は、野外における IB の発生状況 (IB はワクチン投与後しばらくしてからが最も発生しやすい) の疫学的分析からも支持されており、長い間養鶏に携わってきた関係者の IB に対する印象とも

一致するものです。養鶏場当たり1万羽以上の規模が一般的ですが、一群1万羽以上の規模で、30年以上にわたり、このような感染実験が行なわれてきたとすれば、大きな問題です。コロナウイルスの中でも、IBウイルスだけに抗原変異や組換えウイルスが多く、病原性が多様な理由は、多数羽飼育と再三のワクチン投与が関係するのかも知れません。いずれにせよ、IBの予防という難題を考えると、抗原性の異なるワクチン株を次々に世に出していく、これまでの予防法を根本から見直す必要があるようです。そのためには先ず、コロナウイルスの分子生物学を理解することから始めてみました。

### コロナウイルス RNA 合成の機構

コロナウイルスはエンベロープのある一本鎖RNAウイルスで、RNAウイルスの中では最も大きな32キロの遺伝子を持っています。そして、ウイルスが細胞に感染すると、ウイルス粒子から出てきた genomic RNA から、7本の subgenomic mRNA が作られ、これら合計8本の mRNA から8つのウイルスタンパクが合成されます。コロナウイルス RNA の転写 (subgenomic RNA の合成) は非連続的に行なわれるという点でユニーク

です。現在コロナウイルス RNA の転写を説明できる2つの仮説があります (図1)。このウイルスの転写において、leader という小さな RNA フラグメントが重要な働きをすることが明らかにされています。一つの仮説は、テンプレートである(-)鎖 RNA 上にある、leader と相補的な塩基配列領域 (IG) に leader が結合し、これが primer となり subgenomic RNA が合成されるというものです (leader-primed transcription)。もう一つの仮説は、(-)鎖 RNA の合成過程で IG 部位まで到達した(-)鎖 RNA はジャンプして(-)鎖 RNA の leader と結合し、各サイズの(-)鎖 subgenomic RNA が作られ、これがテンプレートとなり subgenomic mRNA が作られるというものです。いずれにしても、leader sequence とその body sequence が結合し、大きさの異なる subgenomic RNA が合成されるのは確かで、全ての subgenomic mRNA の 5'には leader 構造があります。また、テンプレートとなる genomic RNA 上には、leader と結合すると考えられる IG が7か所にあるために、subgenomic mRNA が7本作られるのでしょう。現在は leader-primed transcription の仮説が有力ですが、近い将来には、どちらの仮説が正しいかが明らかにされるでしょう。

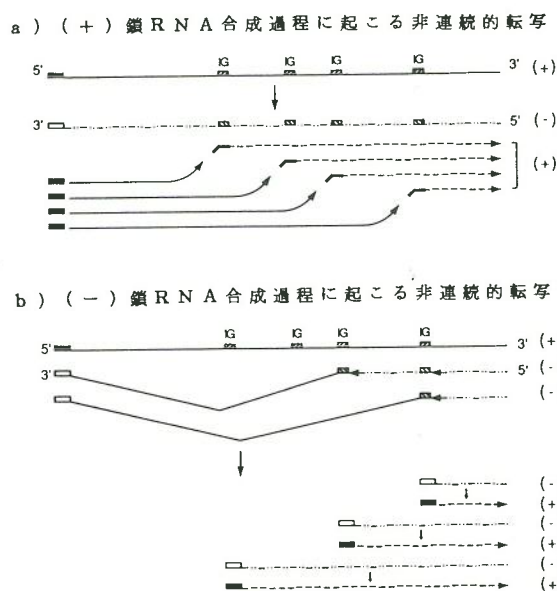


図1 コロナウイルスに特徴的な leader を介した非連続的な RNA 合成

### コロナウイルス RNA 合成に関与するタンパク質

コロナウイルス RNA のそれぞれの合成過程でシスに働く領域が明らかにされました (図2)。(-)鎖 RNA の合成には、(+ )鎖 RNA 上の 3'にある55塩基が、また、(+ )鎖 RNA の合成には、(-)鎖 RNA 上の3つの領域が、そして、mRNA の合成には(+ )鎖 RNA 上の2領域がそれぞれ必要です。mRNA の合成に必要な領域には leader や IG が含まれています。leader および IG に結合する細胞タンパクが報告され、mRNA 合成に関与するであろう細胞タンパクの可能性が示唆されています (図3)。しかし、遺伝子は単離されておらず、本当の役割は

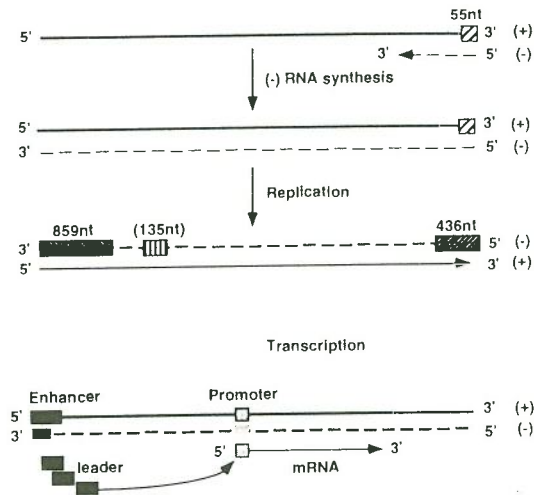


図2 (-)鎖RNA, (+)鎖RNAおよびmRNAの合成に必要なテンプレート上の遺伝子領域

将来の課題でしょう。一方、これらRNA (leader, IG) と結合するウイルスタンパクとしては、Nタンパク以外は不明です。ウイルスポリメラーゼなどのRNA合成に重要な働きをするウイルスタンパクはその存在さえも明らかにされていません。大腸菌で発現させたウイルスタンパクから、抗血清を作製し、感染細胞中のウイルスタンパクを同定しようと試みられていますが、2~3のウイルスタンパクが確認されたに過ぎず、役割はまったく不明です。したがって、RNA合成に関与する細胞およびウイルスのタンパクについては、ほとんど明らかにされていないので、将来の大きな研究テーマでしょう。

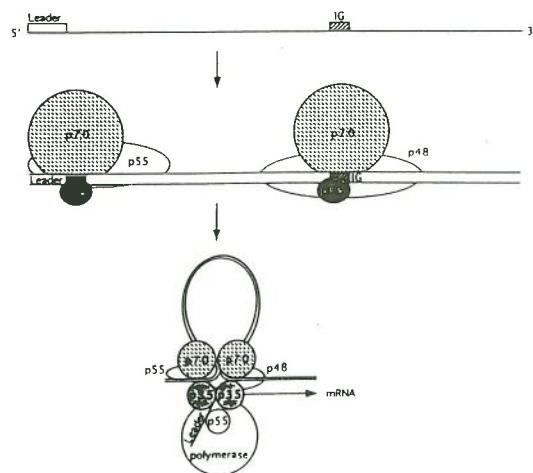


図3 Leader および IG に結合する細胞タンパク

### 新しい組換えワクチン

転写過程でジャンプが起こり mRNA が作られるのはコロナウイルスだけの特徴です。この複雑な転写機構のために、組換えウイルスが作られやすいと考えられています。組換えのホットスポットははっきりせず、32キロの遺伝子の全領域で起こるようです。2つのウイルスを重感染させると、色々な部位に組換えが起こります。また、実験室内では5'または3'の遺伝子断片をウイルス感染細胞に導入すると、これを組み込んだウイルスが作られることが確認されました。しかし、遺伝子の中央部に位置する、感染防御遺伝子(スパイク遺伝子)を、実験室内で組換えることには成功していません。これに成功すれば、ワクチン株に野外株の抗原性を持たせることができるので、野外株の抗原変異に対応したワクチンを迅速に作出できることになります。この組換えワクチンの性状は、抗原性以外(免疫原性や病原性)は親のワクチン株と変わらないのです。したがって、各野外株を馴化して作ったワクチンを次々に鶏に投与していくより、抗原性以外は遺伝子構造が一定の各組換えワクチンを投与していく方が、たとえ組換えを起こしても病原性の変化は起こりにくいという点で、安心して使えるのです。コロナウイルス感染症の新しい予防法の可能性があるので、この分野の研究発展が望まれます。

### アメリカの研究体制

アメリカに行っても学ぶことはなくなったと耳にします。また、アメリカの研究基礎力は低下しつつあるが、日本の基礎研究は発展しようとしていると新聞などに書かれています。しかし、日本が研究分野に力を入れようとしており、更に発展していきだろことは正しいとしても、アメリカがそんなに貧弱な国だとは思いませんでした。

アメリカでは研究が NIH グラントで支え

られています。研究費の削減からグラント取りは年々難しくなっています。採用されるのは応募課題の10%以下です。相当ユニークな研究、ブレイクスルーする研究、メカニズムを解明する研究などの面白い研究だけにグラントが与えられます。一旦グラントが取れると、年間3,000万円の予算が5年間続きます。その研究費の中で、大学院生(150万円)とポスドク(250万円)の給与、機械費、消耗品費、学会旅費などが支払われます。このグラントで年間4~5人の研究員を雇うことが可能でしょうから、かなり大がかりな研究が可能と思われます。その中で蓄積されたデータから、興味深い分野を切り開ける素材があれば次のグラントがアプライできます。過去5年間の研究がproductiveであること(Virologyクラスの論文が最低10~15以上)もグラント取り競争の条件です。一方、学生は学位取りに、ポスドクは次のポジション取りに論文は必須ですし、そもそも競争の激しい分野ですから、いつよその研究所から先に論文が発表されてもおかしくありません。このような状況下ですから、日本の研究者より必死に研究に取り組まなければなりません。このように、豊富な予算、優れた研究素材ばかりか、大学院生やポスドクといったヤングパワーも全世界から集まってきて、統括だけの教授の基で、研究成果が競われているのです。そんな活発な教授が、アメリカにはウイルス分野だけで約500人はいるのです。したがって、グラントをとって活発な研究をすることは、世界で名をなす以外に道はないわけですから大変です。アメリカは一国ではなく、“Its a small world”なのです。日本で活躍している人でもNIHグラントをとれるか、日本で評価されている研究成果がアメリカではどの程度に評価されるかなどは考えてみる

必要があります。たぶん、他の分野でも状況は同じと思われます。

日本の研究環境が良くなるとしても、成果がそれに見合うかについては、個人的には疑問もあるのです。野茂が大リーガーとして活躍できたとしても、あるいは昨年は活躍できたとしても、アメリカのレベルが低いわけではありません。アメリカがリードする世界の研究体制は今後も続くように思えます。帰国後は相当心して研究に取り組む必要があると感じました。

#### おわりに

2年間のロスでの研究生活でしたが、アメリカ社会に対する考え方、研究の流れ、生活の楽しみ方など色々知ることができました。英語の未熟さのために一人前扱いされなかったり、日本人は一段低く見られたりすることも相当にありました。しかし、アメリカの懐の深さに感心したり、人生の価値観さえも大きく異なることに驚いたり、より本質にせまるアメリカの基本姿勢に同感したりもしました。また、良いことは良く、悪いことは悪い。原則重視で、運用は個人の裁量と責任で行う点はスッキリしています。したがって、個人の人生観や価値観に、かなり忠実に生きることが出来ます。また、命令指揮系統がはっきりしており、上司の判断と責任でことが運ばれ、その結果次第で上司が評価されるといった点も優れた点だと思います。

治安の悪さ、英語の難しさ、情報不足など苦勞することも多かったし、運がなく大きな成果はえられませんでした。留学して良かったと思いますし、今後の研究方向に大きな影響を受けました。

## 特別情報

## 細胞育種技術の進捗状況

## 1995年度

農林水産省 農業生物資源研究所 細胞育種部

大澤勝次

この資料は、1995年12月1日現在の細胞育種技術の進捗状況について、農業研究センター、農業生物資源研究所、野菜・茶業試験場、果樹試験場、草地試験場、森林総合研究所、北海道農業試験場、中国農業試験場、九州農業試験場、及び熊本県農業研究センター、群馬県農業総合試験場、茨城県農業総合センター生物工学研究所、大阪府立大学農学部との協力を得て取りまとめたものである。関係各位の御協力にお礼申上げる。なお、文責は細胞育種部長（Tel. 0298-38-8360, Fax. 0298-38-8397）が負うものである。

## 1. 特記事項—本年度の特徴—

- 1) 昨年までほぼ半々だった培養系（植物体再分化技術）と技術系（細胞育種技術）の引用文献数が本年は技術系が大幅に増え、細胞育種技術は技術の応用と実用化に大きく動き出していることが示された。
- 2) 技術系のうちウイルスフリー化技術、人工種子作成技術、試験管内受精技術の3技術については、一部の例外的作物を除き、新たな技術開発の事例は見られなかった。
- 3) 組換えDNA技術による形質転換作物の育成とその野外試験の論文が増え、引用文献数の1/3を占めている。したがって、本年の進捗状況調査でマークが最も前進したのは組換えDNA技術である。
- 4) 1994年10月、アメリカではじめて市販された組換えDNA技術による日持ちを良くしたトマト「フレイバーセイバー」につづいて、1995年にはカナダやアメリカでナタネ、ワタ、ダイズ、カボチャなどで、限定的であるが商品化が始まった。海外で育成された形質転換作物の我が国における隔離ほ場試験の実験申請が相次いでおり、これらの商品化について我が国の早急な対応が迫られている。すでにバイオテク植物は商品化の時代に突入したと言える。
- 5) 10年前、全国の植物バイオテク関係者からの強い要望でスタートした本調査は、1年ごとに改善を加えながら徐々に皆さんに認知されるようになり、個々の作物の進捗状況が把握できる唯一の情報として一定の評価を受け、その任務を果たしてきたと考える。10年を経た今、細胞育種技術を取り巻く状況も大きく変化し、その実用化も進んできたので、本年をもって本調査の「歴史的任務」を終了させることにしたいと考える。長い間の御声援、御活用にご感謝申し上げますとともに、御協力いただいた諸兄に心からお礼申し上げます。

## 2. 10年前と現在の細胞育種技術進捗状況の変化

本調査を終了するに当たり、本調査がスタートした1985年の調査結果の一部を活用しながら、この10年間の細胞育種技術進捗状況の変化をまとめてみた。1985年時点で最も培養系の進んでいたタバコとともに、バレイショ、ナタネ、イネ、カンキツの4作物は比較的◎や○マークの多かった作物の例とし、ニンジン、イチゴ、キクの3作物はマークは多くないが特徴的な性質を有する作物の例として、メロン、カキ、チューリップの3作物は当時培養系の開発がほとんど行われていなかった作物の例とし取り上げた。その10年後の結果を5つの細胞培養系及び5つの細胞育種技術について比較した（表1）。そのポイントは以下のようである。

- 1) 実験植物のタバコだけが本調査開始時点、細胞育種技術としてすべての場面で活用可能であったが、10年後の現在では新たにバレイショ、ナタネ、イネ、カンキツがタバコ並みの活用可能な状態に近づいている。
- 2) ニンジン、イチゴ、キクについてはこの10年間にマークは大きく前進したが、個々の作物の特徴がよく表れていて、安定技術(◎)のマークもあるがそれぞれに未開発(×)のマークもみられる。
- 3) 10年前に細胞育種技術がほとんど開発されていなかった。メロン、カキ、チューリップについてはこの10年間の進歩に大きな開きが見られる。総合的に大きく前進したメロンに比べ、わずかに進んだカキ及び、チューリップのようにほとんど前進のみられないものもある。
- 4) 組換えDNA技術は10年前にはタバコとバレイショでその例が知られはじめた頃であったが、10年後の現在では大きく進展した。その背景には個々の作物における細胞培養系の進展と新しい遺伝子導入法の開発があることを忘れてはならない。
- 5) スペースの関係で、ごくわずかな作物の例で述べざるを得なかったことをお許しいただきたい。対象とした作物は全体としてこの10年間の傾向が見えてくるように心掛けたつもりであるが、はたしてどこまで当を得ているであろうか。

私達は今後とも植物の細胞培養技術の開発をベースにした新たな植物バイオテクの道を追求することによって、21世紀の日本農業と世界の食糧生産に貢献したいと考えている。本調査を終えるにあたり、今後とも皆さんの御支援、御協力をお願いする次第である。

OOSAWA Katsuji



表1 10年前と現在との細胞育種技術進捗状況の変化

分類	1985年調査									1995年調査									備考：× 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術		
	細胞培養系			細胞育種技術						細胞培養系			細胞育種技術								
作物名	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術	組換えDNA技術	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術	組換えDNA技術	
① タバコ	—	◎	◎	◎	◎	—	◎	◎	◎	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
② バレイショ	◎	◎	△	◎	△	○	◎	○	△	△	◎	◎	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
③ ナタネ	◎	◎	○	◎	○	△	◎	○	○	×	◎	◎	◎	◎	◎	△	◎	○	◎	◎	◎
④ イネ	◎	◎	○	○	△	△	◎	○	×	×	◎	◎	○	◎	◎	△	◎	○	○	◎	◎
⑤ カンキツ	◎	○	○	△	○	×	○	×	○	×	◎	◎	○	◎	◎	○	○	○	◎	◎	◎
⑥ ニンジン	×	×	×	◎	◎	×	×	△	△	×	×	△	×	◎	◎	△	×	○	◎	○	○
⑦ イチゴ	×	△	×	×	×	○	△	△	×	×	×	◎	△	△	△	○	△	△	×	◎	◎
⑧ キク	△	×	×	△	△	△	×	×	×	×	△	×	×	△	○	○	×	×	×	◎	◎
⑨ メロン	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	△	×	×	◎	△	○	△	○	○	○
⑩ カキ	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	○	×	×	×	×	△	△
⑪ チューリップ	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×

〔用語解説〕

培養系

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

技術

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

3. 細胞育種技術の現状

作物群	分類 作物名	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考： × 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術			
		培養系技術	茎頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	薬培養系	花粉培養系	未受精胚培養系	体細胞不定芽形成系	体細胞胚形成系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術		半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術
普通作物	イネ	◎	—	—	◎	◎	○ <sup>1)</sup>	△	◎	◎	◎	◎	△	○	—	△	×	◎	○	○	◎ <sup>2)</sup>	◎ 安定技術
	コムギ	○	—	—	◎	◎	○	×	○	○	○	—	—	—	×	×	◎	○	×	○ <sup>3)</sup>		
	オオムギ	○	—	—	◎	◎	○	×	○	○	◎ <sup>4)</sup>	○	—	—	△	×	◎	△	×	○ <sup>5)</sup>		
	ダイズ	◎	—	—	◎	△	×	×	○	◎	◎ <sup>6)</sup>	○	—	—	—	×	×	×	○	×	○	
	ササゲ	◎	—	—	◎	△	×	○	×	×	△	△	—	—	—	×	×	×	×	△	△	
	アズキ	◎	—	—	◎	×	×	×	◎	×	×	○	—	—	—	×	×	×	△	×	○ <sup>7)</sup>	
	バレイショ	◎	—	—	◎	◎	○	×	◎	○	◎	◎	◎	◎	◎	×	×	◎ <sup>8)</sup>	◎	◎	◎	
	カンショ	◎	—	—	○	△	×	×	○	○	○	○	○	◎ <sup>9)</sup>	◎	×	×	△	×	△	◎ <sup>10), 11)</sup>	
	トウモロコシ	○	—	—	◎	○	○	△	○	○	○	△	△	—	×	○	○	○	×	○	○	
	ソルガム	×	—	—	○	△	×	×	○	△	○	△	×	×	—	×	×	×	○	×	△ <sup>12), 13)</sup>	
特用作物	テンサイ	○	—	—	○ <sup>1)</sup>	△	×	○	△ <sup>2)</sup>	△	△	△	○	○	△	×	×	△	△	△	△	
	サトウキビ	◎	—	—	○	○	△	×	◎	○	◎ <sup>3)</sup>	○	◎	◎	◎	×	×	○	△	△	○ <sup>4)</sup>	
	コンニャク	◎	—	—	×	×	×	×	△	×	×	△	○	◎	×	×	×	×	×	×	×	
	イグサ	◎	—	—	△	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ナタネ	◎	—	—	◎	◎	◎ <sup>5)</sup>	×	◎	○	◎	◎	△	△	—	×	×	◎ <sup>6)</sup>	○	◎ <sup>7), 8)</sup>	◎ <sup>9)</sup>	
	ラッカセイ	○	—	—	○	△	×	×	◎ <sup>10)</sup>	○	×	△	△	○	×	×	×	×	×	×	○	
	クワ	◎	—	—	×	△	×	×	◎	○ <sup>11)</sup>	△ <sup>12)</sup>	×	◎	◎	×	△	×	×	×	×	△	
	チャ(カメリア)	◎	—	—	◎	◎	×	○	○	×	×	×	○ <sup>13), 14)</sup>	○	×	△	×	△	×	×	×	
飼料作物	イタリアンライグラス	○	—	—	◎ <sup>1)</sup>	○	×	×	○	○	○	○	×	○	×	×	×	×	○	△ <sup>2)</sup>		
	オーチャードグラス	○	—	—	△	×	×	×	○	△	○	△	×	×	○	×	×	×	×	×	△	
	チモシー	△	—	—	△	△	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	トールフェスク	△	—	—	◎	○	×	×	○	○	◎	×	×	×	×	×	×	○	×	◎	◎	
	ペレニアルライグラス	△	—	—	◎	◎	×	×	△	△	○	◎ <sup>3)</sup>	×	×	×	×	×	○	×	△	△ <sup>4)</sup>	
	メドウフェスク	△	—	—	◎	×	×	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	△	×		
	スムーズブroomグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ダリスグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	△	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	バヒアグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	◎	△ <sup>6)</sup>	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	パニカム(ギニアグラス)	×	—	—	△	×	×	×	×	○	○	△ <sup>7)</sup>	×	×	×	×	×	×	×	△	×	
	ローズグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ネピアグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	○	○	△	×	△	×	×	×	×	△	×	×	
パールミレット	×	—	—	×	×	△	×	×	○	○	△	×	△	×	×	×	×	△	△	×		
アカクローバ	○	—	—	◎	×	×	×	×	○	△	△	△	×	○	×	×	×	△	△	×		
シロクローバ	○	—	—	◎	×	×	○	×	○	△	○	△	×	○	×	×	×	×	×	○		

作物群	分類	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考：× 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術				
		培養系技術	莖頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	未受精胚培養系	体細胞不定芽形成系	体細胞胚形成系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術		半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術	組換えDNA技術
	作物名																						
飼料作物	アルファルファ	○	—	—	◎	△	×	×	×	◎	◎	○	○	◎	○	○	×	×	○	○	◎		
	バーズフットレフォイル	×	—	—	×	×	×	×	△	×	×	○	△	×	×	×	×	×	△	△	○		
	スタイロサントス	×	—	—	×	×	×	×	△	×	△	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
芝草類	ベントグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	◎	○	○	×	△	×	×	×	×	△	×	○		
	レッドフェスク	△	—	—	○	×	×	×	×	△	△	△	8)	×	×	×	×	×	×	×	△	8)	
	ノシバ	×	—	—	×	×	×	×	×	△	×	△	×	△	×	×	×	×	×	×	△		
	ケンタッキーブルーグラス	×	—	—	×	×	×	×	△	○	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
野菜	キュウリ	○	—	—	○	△	×	×	◎ <sup>1)</sup>	◎	○	◎	×	○	—	×	×	△	×	△	○	◎	
	メロン	○	—	—	○	△	×	△	○	◎	×	◎	△	○	—	×	△	○	△ <sup>2)</sup>	○	○		
	スイカ	○	—	—	△	△	△	×	○	○	×	×	×	○	—	×	△	△	×	×	△		
	カボチャ	○	—	—	○	×	×	×	○	○	×	×	×	△	—	×	△	△	×	△	◎ <sup>3), 4)</sup>		
	トマト	◎	—	—	◎	○	×	×	○	△	×	○	△	◎ <sup>5)</sup>	—	×	×	△	○	○	◎		
	ナス	◎	—	—	○	◎	△	×	○	◎	○	◎	×	○	—	×	×	◎	×	◎	○		
	ピーマン	◎	—	—	○	◎	×	×	○	△	×	△	×	○	—	×	×	◎ <sup>6)</sup>	×	×	×		
	ダイコン	◎	—	—	◎	○	△	×	○	△ <sup>7)</sup>	×	△	×	×	—	×	×	×	×	△	×		
	キャベツ	◎	—	—	◎	○	○	×	◎	○	×	◎	×	○	—	△	△	○	△	◎ <sup>8)</sup>	△		
	ハクサイ	◎	—	—	◎	◎	◎	×	○	○	×	○	×	△	—	×	○	○	×	○	△		
	ブロッコリー	◎	—	—	◎	◎	◎	×	◎	○	×	◎	×	○	—	×	△	○	×	○	△		
	イチゴ	◎	—	—	×	◎	△	×	○	○	△ <sup>9)</sup>	△	○	◎	◎	×	×	△	△	×	◎		
	タマネギ	◎	—	—	△	△	×	△	○	○	○	△	×	○	△	×	×	△	△	△	△		
	ネギ	○	—	—	△	×	×	×	○	△	○	△	×	○	○	×	×	×	△	×	×		
	ニンニク	◎	—	—	×	×	×	×	◎ <sup>10)</sup>	○	×	×	○	◎	◎	×	×	×	×	△	×		
	アスパラガス	◎	—	—	△	○	△	×	○	◎	◎	○	◎ <sup>11), 12), 13)</sup>	◎	○	×	×	△	△	×	△		
	エンドウ	○	—	—	△	×	×	×	×	△	×	△	△	△	—	×	×	×	×	×	○		
	インゲンマメ	◎	—	—	○	×	×	×	×	△	×	×	×	×	—	×	×	×	×	×	△		
	ニンジン	○	—	—	×	△	×	×	○	◎	◎	◎	△	◎	—	○	×	×	○	◎	○		
	セロリー	○	—	—	×	×	×	×	×	◎	◎	◎	△	◎	—	○	×	×	○	○	○		
レタス	○	—	—	×	×	×	×	○	○	○	◎	◎	◎	—	○	×	×	×	○	○			
ゴボウ	○	—	—	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	—	×	×	×	×	×	×			
サトイモ	◎	—	—	△	×	×	×	△	△	×	△	△	◎	◎	×	×	×	×	×	×			
ヤマノイモ	○	—	—	×	×	×	×	△	△	×	×	△	◎	○	×	×	×	×	×	×			
ハウレンソウ	○	—	—	×	×	×	×	△	◎ <sup>15)</sup>	×	△	×	△	—	×	×	×	×	×	×			
フキ	◎	—	—	×	×	×	×	×	×	×	○	○	◎ <sup>16)</sup>	◎	×	×	×	△	×	×			
キク	◎	—	—	△	×	×	×	◎	△	△	○	○	◎	◎	×	×	×	×	×	◎ <sup>17), 2)</sup>			

作物群	分類 作物名	植物体再分化技術										細胞育種技術										備考：× 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術	
		培養系技術	莖頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	未受精胚培養系	体細胞不定芽形成系	体細胞胚形成系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術	半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術		組換えDNA技術
花	ツツジ類	◎	—	—	△	×	×	×	△	×	×	○	◎	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ユリ類	◎	—	—	◎	×	×	×	◎	×	×	△ <sup>3)</sup>	△	◎	◎	×	△ <sup>4)</sup>	×	×	×	×	×	×
	チューリップ	△	—	—	△	×	△ <sup>5)</sup>	×	○ <sup>6)</sup>	×	×	×	×	△	△	×	△	×	×	×	×	×	×
	カーネーション	◎	—	—	△	×	×	×	○	△	△	△	○	○	◎	×	△	×	△	×	△	×	○
	ラン類	◎	—	—	◎	×	×	×	◎	×	×	△	×	◎	◎	×	×	×	×	×	△	△	△
	ストック	×	—	—	×	×	×	×	△	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	スターチス類	◎	—	—	×	×	×	×	×	×	×	△	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	トルコギキョウ	△	—	—	×	×	×	×	◎	×	×	○	×	○	×	×	×	×	×	△	×	△	△ <sup>7)</sup>
	ペチュニア	◎	—	—	×	○	×	○	◎	×	×	◎	×	◎	○	×	△	△	×	◎	◎	◎	◎
	ヒマワリ	○	—	—	○	×	×	×	○	○	×	○	×	○	×	×	×	×	×	△ <sup>8)</sup>	×	○	○
	リンドウ	○	—	—	×	△	△	×	△	△	×	△	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ガーベラ	◎	—	—	×	×	×	○	△	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	グラジオラス	◎	—	—	×	×	×	×	×	○	△ <sup>9)</sup>	×	×	◎	◎	×	×	×	×	△ <sup>10)</sup>	×	○ <sup>11-13)</sup>	○
	フリージア	◎	—	—	×	×	×	×	×	△	×	×	×	◎ <sup>14)</sup>	◎	×	×	×	×	×	×	×	×
	シクラメン	○	—	—	○	△	×	×	○	○	△	△	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	△
き	ペゴニア類	×	—	—	×	×	×	×	◎	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	プリムラ類	○	—	—	△	△	×	×	△	×	×	×	△	○	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ゼラニウム類	◎	—	—	◎	△	×	×	○	○	×	○	×	○	○	×	×	×	×	×	×	×	
	バラ	○	—	—	×	×	×	×	○	○	△	△	×	◎	○	×	×	×	△	×	○ <sup>15)</sup>	○	
	ツバキ	○	—	—	○	×	×	×	△	○	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	
果	ブドウ	◎	—	—	○	△	△	○	◎	◎	○	△	◎	◎	◎	×	×	△	△ <sup>1)</sup>	△ <sup>2)</sup>	△ <sup>3)</sup>	△ <sup>4)</sup>	
	カキ	◎	—	—	○	×	×	×	△	△	×	○	×	◎	×	×	×	×	×	△	△	△	
	クリ	○	—	—	×	×	×	×	△	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ビワ	○	—	—	×	×	×	×	×	△	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	
	オウトウ	◎	—	—	○	×	×	×	△	×	×	○	△	◎	○	×	×	×	×	△	×	×	
	西洋ナシ	◎	—	—	×	×	×	△	△	×	×	○	○	◎	○	×	×	×	×	△	×	×	
	パイナップル	◎	—	—	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ブルーベリー	◎	—	—	△	×	×	×	○	×	×	×	△	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	
	キウイ	◎	—	—	△	×	×	×	◎	×	○	○	△	◎	×	×	×	×	×	×	◎ <sup>5)</sup>	◎	
	樹	ザクロ	◎	—	—	×	×	×	×	○	×	○	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×
カンキツ		◎	—	—	◎	◎	○	◎	△	◎	◎	◎	○	◎	◎	×	×	○	○	◎	◎	◎	
リンゴ		◎	—	—	○	△	△	○	◎	△	△ <sup>6)</sup>	○	○	◎	◎	×	×	△	×	×	◎	◎	
日本ナシ		◎	—	—	×	×	×	×	△	△	×	×	○	◎	◎	×	×	×	×	×	×	×	
モモ		◎	—	—	◎	×	×	×	○	○	×	×	△	◎	◎	×	×	×	○	×	△	△	

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

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

[技術評価]

- × 未開発 研究が行われていないか、または実施されていても未だ成果が報告されていない。
- △ 報告あり 1報でもポジティブな報告がある。
- 可能 複数の研究者から報告があり、再現性が確かめられている。
- ◎ 安定技術 該当培養系を用いた開発研究が行われている。

4. 細胞育種技術の進捗状況文献

1995年調査で新たに△, ○または◎になったものを中心に記載

普通作物

- 1) イネ  
Ogawa, T. et al. (1995) *Breeding Science*, 45 : 301-307
- 2) イネ  
Li, Z. and N. Murai (1995) *Plant Science*, 108 : 219-227
- 3) コムギ  
Maheshwari, N. et al. (1995) *Critical Reviews in Plant Science*, 14 : 149-178
- 4) オオムギ  
Stirn, S. et al. (1995) *Plant Science*, 106 : 195-206
- 5) オオムギ  
Funatsuki, H. et al. (1995) *Theor. Appl. Genet.*, 91 : 707-712
- 6) ダイズ  
Knops, M. et al. (1995) *Plant Science*, 109 : 215-224
- 7) アズキ  
Ishimoto, M. et al. (1995) *Entomologia Experimentalis Applicata*, 74 (in press)
- 8) バレイショ  
Rokka, Veli-Matti et al. (1995) *Plant Science*, 112 : 85-95
- 9) カンショ  
Pido, N. and Y. Kowiyama (1995) *Breeding Science*, 45 : 331-336
- 10) カンショ  
Newell, C. A. et al. (1995) *Plant Science*, 107 : 215-

227

- 11) カンショ  
岡田吉弘ら (1995) 育種学雑誌, 45(別2) : 116
  - 12) ソルガム  
Casas, A.M. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. US A*, 90 : 11212-11216
  - 13) ソルガム  
萩尾高志ら (1995) 育種学雑誌, 45(別1) : 60
- 特用作物
- 1) テンサイ  
Wang, Y.Q. et al. (1995) *Review of Advances in Plant Biotechnology*, (International Symposium for Sugar Beet, Beijing, 1994.9.1~6) : 69-75
  - 2) テンサイ  
玉掛秀人 (1995) 第14回植物組織培養学会講演要旨, p.137
  - 3) サトウキビ  
松岡 誠ら (1995) 植物組織培養, 12 : 193-196
  - 4) サトウキビ  
Callo-Meagher. et al. (1994) *Plant Genome II* (The Second International Conference on the Plant Genome, 1994, California), p.64
  - 5) ナタネ  
Nehlin, L. et al. (1995) *Plant Science*, 111 : 219-227
  - 6) ナタネ  
Alabrecht, S. et al. (1995) *Plant Breeding*, 114 : 210-214
  - 7) ナタネ

- Heath, D.W. and E.D. Earle. (1995) *Theor. Appl. Genet.*, 91 : 1129-1136
- 8) ナタネ  
Liu, Ji-Hong *et al.* (1995) *Plant Science*, 109 : 75-86
- 9) ナタネ  
Denis, M. *et al.* (1995) *Plant Breeding*, 114 : 97-107
- 10) ラッカセイ  
Chengalrayan, K. *et al.* (1995) *Plant Science*, 110 : 259-268
- 11) クワ  
片桐幸逸・Nguyen Tien Thinh (1995) 日蚕雑, 64 : 469-471
- 12) クワ  
Shajahan, A. *et al.* (1995) *Breeding Science*, 45 : 413-417
- 13) チャ  
Suyian, Yang, *et al.* (1993) *J. Tea Sci.* (茶葉科学) 13 : 27-31 (中国語, 英文サマリー付)
- 14) チャ  
青島陽一 (1995) 茶業研究報告, 82(別) : 42-43
- 飼料作物・芝草類
- 1) イタリアンライグラス  
Kumlehn, J. and W. Nitzsche (1995) *Plant Science*, 111 : 107-116
- 2) イタリアンライグラス  
Dalton, S.J. *et al.* (1995) *Journal of Experimental Botany*, 46 (May supplement) : 34
- 3) ペレニアルライグラス  
Folling, M. *et al.* (1995) *Plant Science*, 108 : 229-239
- 4) ペレニアルライグラス  
Spangenberg, G. *et al.* (1995) *Plant Science*, 108 : 209-217
- 5) メドウフェスク  
佐々木 亨・植田精一 (1995) 日草誌, 44(別) : 105-106
- 6) バヒアグラス  
Akashi, R. *et al.* (1993) *Plant Science*, 90 : 73-80
- 7) パニカム (ギニアグラス)  
Akashi, R. *et al.* (1995) *Breeding Science*, 45 : 445-448
- 8) レッドフェスク  
Spangenberg, G. *et al.* (1994) *Plant Science*, 97 : 83-94
- 野菜
- 1) キュウリ  
Burza, W. and S. Malepszy (1995) *Plant Breeding*, 114 : 341-345
- 2) メロン  
Ezura, H. *et al.* (1995) *Plant Cell Reports*, 14 : 684-688
- 3) カボチャ  
Tricoli, David M. *et al.* (1995) *Bio/Technology*, 13 : 1458-1465
- 4) カボチャ  
Fuchs, M. and D. Gonsalves (1995) *Bio/Technology*, 13 : 1466-1473
- 5) トマト  
Ichimura, K. *et al.* (1995) *Plant Science*, 108 : 93-100
- 6) ピーマン  
Mityko, J. *et al.* (1995) *Plant Breeding*, 114 : 78-80
- 7) ダイコン  
Won, J. Jeong. *et al.* (1995) *Plant Cell Reports*, 14 : 648-651
- 8) キャベツ  
Hansen, L.N. and E.D. Earle (1995) *Theor. Appl. Genet.*, 91 : 1293-1300
- 9) イチゴ  
Mori, T. and M. Sakurai (1995) *Plant Science*, 110 : 147-153
- 10) ニンニク  
佐藤健治ら (1995) 植物組織培養, 12 : 259-265
- 11) アスパラガス  
May, R.A. and K.C. Sink (1995) *Plant Science*, 108 : 71-84
- 12) アスパラガス  
Kohmura, H. *et al.* (1992) *Plant Cell Reports*, 11 : 433-437
- 13) アスパラガス  
Nishizawa, S. *et al.* (1992) *Cryo-Letters*, 13 : 379-388
- 14) サトイモ  
Murakami, K. *et al.* (1995) *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 63 : 773-778
- 15) ホウレンソウ  
Komai, F. *et al.* (1995) *Plant Tissue Culture Letters*, 12 : 313-315
- 16) フキ  
岩本 嗣・嘉儀 隆 (1995) 園芸学雑誌, 64 : 103-111
- 花き
- 1) キク  
Fukai, S. *et al.* (1995) *Breeding Science*, 45 : 179-184
- 2) キク  
Benetka, V. and D. Pavingerova (1995) *Plant Breeding*, 114 : 169-173
- 3) ユリ類  
Mii, M. *et al.* (1994) *Plant Science*, 100 : 221-226
- 4) ユリ類  
Willemsse, M.T.M. *et al.* (1995) *Plant Science*, 108 : 201-208
- 5) チューリップ  
Van den Bulk, R.W. *et al.* (1994) *Plant Science*, 104 : 101-111
- 6) チューリップ  
Wilminck, A. *et al.* (1995) *Plant Science*, 110 : 155-164
- 7) トルコギキョウ  
Semeria, L. *et al.* (1995) *Euphytica*, 85 : 125-130
- 8) ヒマワリ  
Barotti, S. *et al.* (1995) *Plant Breeding*, 114 : 275-276
- 9) グラジオラス  
Remotti, P.C. (1995) *Plant Science*, 107 : 205-214
- 10) グラジオラス  
霞 正一ら (1995) 園芸学雑誌, 64(別2) : 476-477
- 11) グラジオラス  
友常秀彦ら (1994) 育種学雑誌, 44(別2) : 46

- 12) グラジオラス  
Kamo, K. *et al.* (1995) *J. American Soc. Hort. Sci.*, 120 : 347-352
- 13) グラジオラス  
Kamo, K. *et al.* (1995) *Plant Science*, 110 : 105-111
- 14) フリージア  
平田 毅ら (1995) 植物組織培養, 12 : 41-45
- 15) バラ  
Firoozabady, E. *et al.* (1994) *Bio/Technology*, 12 : 609-613
- 果 樹
- 1) ブドウ  
Yamakawa, Y. and Li-Hong Chen (1995) *Plant Tissue Culture Letters*, 12 : 197-200
- 2) ブドウ  
Mauro, M.C. *et al.* (1995) *Plant Science*, 112 : 97-106
- 3) カキ  
Tamura, M. *et al.* (1995) *Plant Science*, 108 : 101-107
- 4) カキ  
田尾龍太郎ら (1995) 園芸学雑誌, 64(別2) : 168-169
- 5) キウイ  
Yazawa, M. *et al.* (1995) *Breeding Science*, 45 : 241-244
- 6) リンゴ  
Ai-Ping, Ding *et al.* (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40 : 145-149
- 7) ウメ  
村井泰広・原田 久 (1995) 植物組織培養, 12 : 325-327
- 樹 木
- 1) ヒノキ  
石井克明ら (1995) 第45回日本木材学会発表要旨, p.7
- 2) カラマツ  
荻田信二郎ら (1995) 第14回植物組織培養学会講演要旨, p.46
- 3) シラカンバ  
Vaario, Lu-Min *et al.* (1995) *Plant Tissue Culture Letters*, 12 : 251-258
- 4) シラカンバ  
脇田陽一ら (1995) 第106回日本林学会講演要旨, p.690
- 5) キリ  
毛利 武ら (1995) 第106回日本林学会講演要旨, p.696
- 6) ミズメ  
近藤 晃ら (1995) 第106回日本林学会講演要旨, p.688
- 7) シナノキ  
Chalupa, V. (1995) Joint Meeting on Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Trees, (Gent, Belgium) p.67
- 8) サクラ  
佐藤孝夫 (1995) 第106回日本林学会講演要旨, p.710
- 9) ユーカリ  
Tibok, A. *et al.* (1995) *Plant Science*, 110 : 139-145



脂質の漏出が疑われる。また、細胞膜の崩壊も随所でみられ、豚胚の耐凍性の低さを再認識した。拡張胚盤胞でも量的には少なくなつて来ているとはいえ、まだまだ大型の脂肪滴が散在している (図2)。

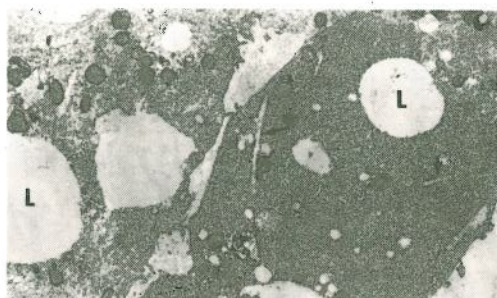


図2 凍結融解後の拡張胚盤胞  
ステップワイズ法で融解後2時間経過している。内細胞塊の細胞。亀裂様構造物(矢印)が散見される。まだまだ大型の脂肪滴(L)がみられる。

## (2) ガラス化凍結法

Veldezらがマウス胚で用いた方法ならびに浜野らが牛卵胞卵形で用いた方法をもとに試行してみたが、豚胚では融解後の生存胚は得られなかった。ガラス化溶液は耐凍剤の濃度が高く毒性も高いと思われ、ガラス化溶液に豚胚を入れただけで死滅したという報告もあるため、溶液そのものやその添加法、除去法についても検討が必要であろう。最近、培養試験では非常に良い成績を出しているところもあるが、まだ移植による産子は得られていない。

## (3) ダイレクト法

グリセロールを用いたステップワイズ法とプロピレングリコール、エチレングリコール

表4 個体差 (ステップワイズ法)

固体No	胚数	融解後 2h		融解後48h	
		生存胚	移植可能胚	生存胚	脱殻胚
7	11	10(90.9%)	5(45.5%)	10(90.9%)	5(45.5%)
89	16	2(12.5%)	0	2(12.5%)	0

凍結溶液; 1.5M グリセロール+20%調整血清+1%デキストラン inM199

それぞれ単独でのダイレクト法との比較の培養試験ではグリセロールが最も良かった。その後、当所の牛胚の凍結試験からプロピレングリコールとエチレングリコールの混合溶液を試したが、培養成績ではやはりステップワイズ法より良くない (表3)。ただし、ダイレクト法の培養成績での評価はステップワイズ法よりも悪くなってしまうことがあり、必ずしも移植成績と一致しないことがある。ステップワイズ法の場合でも融解後の耐凍剤希釈から培養開始の段階でかなりダメージを受けている様子がかがわれているため (3段階よりも5段階が良かったこともあり)、また豚ではダイレクト法での移植試験がどこでも実施されていないため試行してみた。

## 3. 移植試験

多胎動物であるため、受胚豚の妊娠率とともに産子率 (産子数/移植胚数) も重要になってくる。当所では表5に示した例数しか移植試験を実施してはいるが、他所に比べ異常に妊娠率が高い。その理由については不明であるが、基本的な胚の取扱や手術の方式などにも違いがあるかも知れない。ステップワイズ

表5 豚凍結保存胚の移植成績

No	凍結法	胚品種	融解胚数	移植胚数 (融解胚%)	産子数<移植胚%> (融解胚%)	分娩月日/備考
1	SW-1	LWH	37	20 (54%)	3頭<15%> (8%)	90年4月17日/うち死産1+ミイラ1
2	SW-2	LWHD, WLD	50	20 (38%)	5頭<25%> (5%)	91年9月24日
3	Direct	D	20	20(100%)	10頭<50%> (50%)	95年6月12日/うち死産2
4	SW-3	D	35	20 (57%)	不受胎	
5	SW-3	D	49	20 (41%)	2頭<10%> (4%)	95年6月21日
6	Direct	D	20	20(100%)	1頭<5%> (5%)	95年6月25日

注) 凍結法 SW: ステップワイズ法

SW-1; 1.5M グリセロール+20% FCS+0.05% レシチン inPBS

SW-2; 1.5M グリセロール+20% FCS+0.05% トコフェロール inPBS

SW-3; 1.5M グリセロール+20%調整血清+1%デキストラン inM199

Direct: ダイレクト法 (ただし、移植法は外科的。胚は融解後に溶液はそのまま移植用カテーテルに移しかえる。)

胚品種, D; デュロック, W; 大ヨーク, L; ランドレース, H; ハンプシャー

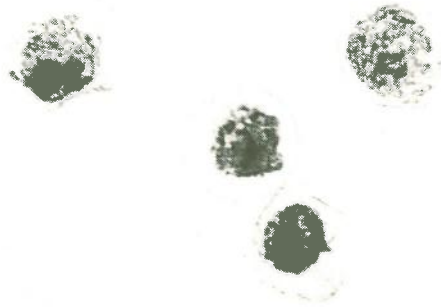


図3 凍結融解後の拡張胚盤胞

ダイレクト法の融解直後。凍結溶液中に浮遊しているため、正常な形態にみえないが、この後、直ちに移植用カテーテルに移し換えて移植し、受胎した。



図4 凍結保存胚の移植による産子  
(ダイレクト法、平成7年6月12日分娩)

法でも4頭中3頭が妊娠しているが、融解胚数からみると生産率は非常に低い。ダイレクト法では2頭とも受胎した。また、生産率も良好な成績のものもあったため、実用化の期待が大きく膨らんだとはいえる。ただし、いずれにしてもまだまだ例数が少な過ぎるため、今後の試験でさらに膨らませたいと考える(図3, 4)。

#### 4. おわりに

全農には豚の系統造成部門と2つの原種豚場があるため、豚胚の凍結保存が可能になれば系統豚の維持や種豚場間の豚の輸送に胚移植が即応用できる。1~2頭の供胚豚から受胚豚1頭分の凍結胚を確保し、8頭生産できれば事業へ移行できるという具体的な数値目標を掲げて取り組んでいる(供胚豚2頭からの場合、品種を変えて産子の血統を明らかにする)。この場合、系統豚の維持等に豚を飼い

続けるよりもコストが低減できるうえにジーンバンクや豚の輸送手段として利用できる。今後も家畜受精卵移植技術研究組合や豚新技術開発研究会の協力を仰ぎながら実用化へ向けて試験を進めていく予定である。

#### 文 献

- 1) 第3回豚新技術開発研究会資料；平成7年2月16, 17日, 農林水産省家畜改良センター
- 2) Wilmut, I (1972) *J. Reprod Fert.*, 31 : 513-514
- 3) Nagashima, H., Y. Kato, H. Yamakawa and S. Ogawa (1988) *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 34 : 123-131
- 4) 林 哲・小林一彦・水野仁二・斉藤邦男・平野 進(1989) *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35 : 135-139
- 5) 小栗紀彦(1989) 第53回日本養豚学会講演要旨 p.48-54
- 6) 亀山賢次・武富敏郎・板倉はつえ・鬼原辰夫(1990) 第78回家畜繁殖学会講演要旨, I-54
- 7) 柏崎直巳・大谷 悟・宮本勝巳・棚井幸雄・添田益夫・杉本輝夫・武田光彦・八下田幸男(1990) 第78回家畜繁殖学会講演要旨, I-57
- 8) Nagashima, H., N. Kashiwazaki, R. J. Ashman, C. Grupen, R. F. Seamark and M. Nottle (1994) *Theriogenology*, 41 : 113-118
- 9) Nagashima, H., N. Kashiwazaki, R. J. Ashman, C. G. Grupen, and M. B. Nottle (1994) *Nature*, 374 : 416
- 10) 亀山賢次・高坂哲也・武富敏郎・鬼原辰夫(1991) 第80回家畜繁殖学会講演要旨, I-55
- 11) Veldez, C. A., O. AbasMazni, Y. Takahashi, M. Hishinuma and H. Kanagawa (1990) *Theriogenology*, 33 : 627-636
- 12) 浜野晴三・桑山正成・小池田明子(1991) 第80回家畜繁殖学会講演要旨, I-44
- 13) 小栗紀彦(1989) 動物遺伝資源の長期保存法に関する研究(農林水産技術会議事務局), p.63-68

#### 編集後記

本誌の創刊準備号(1987年3月発行)以降、毎年3月号には、当該年度の「細胞育種技術の進捗状況」を、農業生物資源研究所の歴代細胞育種部長(大山勝夫氏、中島阜介氏、大澤勝次氏)の御好意によって掲載してきました。当時は企業や公立試験研究機関が本格的にバイオテク研究を始めた時期で、以来10年間購読会員や関係方面の皆様から御活用いただき、好評を博してまいりました。農業生物資

源研究所としては、本調査開始以来10年を経過し、初期の目的を達成し、歴史的任務を終えたとの判断から、本年度で調査を終了することにされましたので、本誌でも本号で掲載を終ることになりました。歴代の細胞育種部長には、年度末の忙しい時期に膨大な資料をまとめ原稿を提供していただきました。編集者として厚くお礼申し上げます。(大畑記)

#### お詫びと訂正

前53号、19頁、左段の最下行の下に、  
プロピレングリコール、エチレングリコール  
同頁右段最下行の下に  
も違いがあるかも知れない。ステップワイズ

が抜けていました。

つきましては、本号の末尾後に、前53号19頁20頁の刷り替え紙を挿入しておきましたので、お手をかけますが53号19頁の上に貼って下さい。

以上、お詫びして訂正します。

## ブレインテクノニュース (第54号)

平成8年3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