

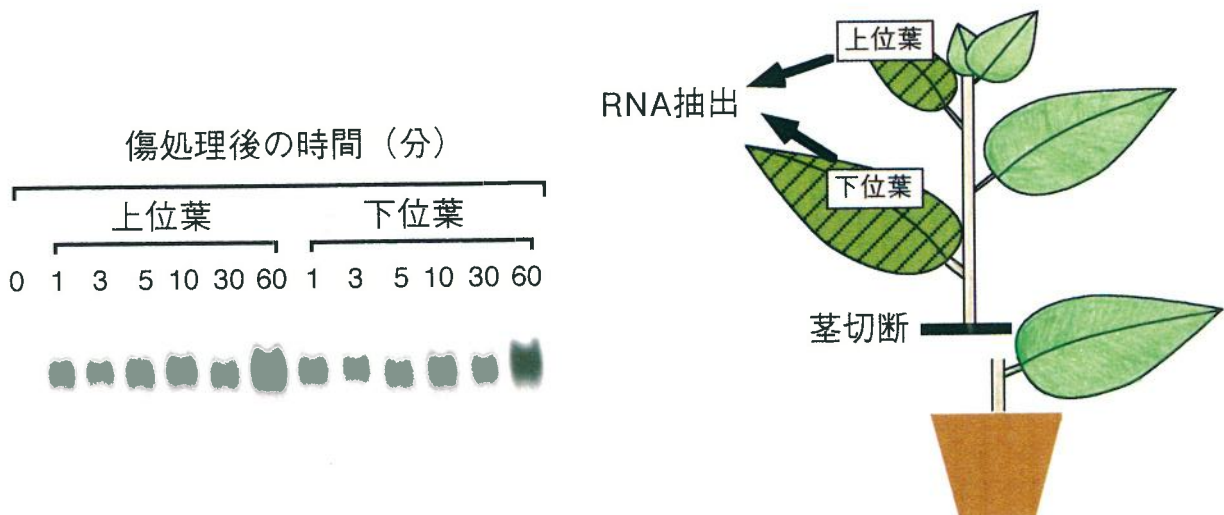
# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

生研機構設立10周年記念特集

バイオテクノロジー10年の展開と今後の展望

タバコ植物体の茎を切断したときの健全葉におけるWIPK mRNAの挙動



傷によって1分以内に素早く応答する新しい遺伝子 *WIPK* を発見  
(本文5ページ参照) (農業生物資源研究所 抵抗性遺伝子研究室)

## 総 説

飯村 穰

酵母のバイオテクノロジー，10年の展開と今後の展望…………… 1

ポストシーケンシング時代における実用酵母の分子育種

大澤勝次

植物のバイオテクノロジー，10年の展開と今後の展望…………… 5

角田幸雄

動物のバイオテクノロジー，10年の展開と今後の展望……………10

和田克彦

魚介類のバイオテクノロジー，10年の展開と今後の展望……………13

## 国内情報

小鞠敏彦

アグロバクテリウム利用のコ・トランスフォーメーションによる選抜マーカーを含まない

形質転換植物の作出……………18

林 清

キラメ化による酵素の耐熱性向上……………22

## 地域の先端研究

平佐隆文・富川康之

シヨウロの増産技術……………27

## 文献情報

培養細胞の核移植によるクローンの成功……………30

鉄を食べやすくする (?) 原生動物……………30

酵母が飢餓状態で長期にわたり生き延びるためのメカニズム……………31

高等植物で最も半減期の短い SAUR-AC1 遺伝子の不安定性に關与する配列……………32

## 海外便り

中島 隆

カナダでのコムギ雪腐病抵抗性に関する研究……………34

## 酵母のバイオテクノロジー ～10年の展開と今後の展望～

ポストシーケンシング時代における実用酵母の分子育種

国税庁 醸造研究所  
飯村 穰

酵母はポストシーケンシング時代を迎えており、生物のモデル系としての酵母の研究はますます重要となる。一方、実用酵母の分子育種についても、これまでに確立された相同的組換えに基づく形質転換技術とゲノムシーケンシングのデータベースの活用により、新しい展開が期待される。ここでは、これまでの成果を踏まえ、これからの分子育種の一方向を考察する。

### 1. はじめに

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) におけるゲノムの塩基配列が全て決定され本年4月に開示された。その大きさは約13Mbpで100個以上のアミノ酸からなる ORF が5,000 から6,000個存在すると推定されており、その40%以上の機能が不明とされる。これまで酵母は真核生物のモデルあるいは病理解析のためのモデル系として、その細胞の構造と機能の解明が進められ、その範囲は細胞周期、DNA複製、減数分裂、胞子形成、DNA組換え、修復、遺伝子発現制御、RNA プロセッシング、翻訳、オルガネラの形成、細胞の構造と形態形成、シグナリング、タンパク質輸送、膜形成および代謝制御に及んでいる<sup>1)</sup>。ゲノムシーケンシングの解析によって、モデル生物としての酵母の役割は今後ますます重要になってくるものと思われる。

一方、酵母のバイオテクノロジー分野では遺伝子工学を中心に実用株育種への期待感を伴っていくつかの研究開発が行われてきたが、例えば酒類等の醸造あるいはパン酵母製造といった実用分野での新しいバイオテクノロジーの展開は基礎研究の分野に比べるとはるかに遅く、このことは複雑な生命現象を生産現場で応用することの難しさを示している。

しかし、ポストシーケンシング時代を迎え、ゲノムシーケンシングを共通基盤として、基礎と応用が今まで以上に密接になる可能性も生まれてきている。

ここでは、酵母バイオテクノロジーの特徴と近年の研究動向を酒造用酵母を中心に概観した後、ポストシーケンシング時代の酵母応用研究の一方向と最後に筆者らの研究例を紹介する。

### 2. 酵母バイオテクノロジーの特徴

まず形質転換法の一つとして相同的組換えに基づく外来遺伝子の染色体 DNA 特定部位への組込みが挙げられる<sup>2)</sup>。他の酵母でも最近 *Hansenula anomala* 等で相同的組込み型による形質転換が報告されているが、他の有用微生物、例えば麹菌 (*Aspergillus oryzae*) における染色体への組込みは多くの生物と同様ほとんどが不特定な部位で起こることを考えると、相同的組換えは酵母にとって最大の長所といえる。これによって部位を特定した外来 DNA の挿入、削除および置換をほぼ自由に行うことが可能になった。二番目の特徴は人工染色体の開発である。酵母では本来の染色体機能部位である ARS, CEN, TEL の連結により人工染色体を構築することができる。しかも、この染色体では本来の染色体と同様、相同的組換えが起こり、遺伝解析や染色体操作が可能である。人工染色体 YAC

ベクター<sup>3)</sup>は1,000kbpにも及ぶ大きなDNAのクローニングを可能とし、酵母自体の育種は勿論、その他の生物のゲノム解析に大きな威力を示している。特記すべきもう一つの特徴は大量発現技術の開発である<sup>4)</sup>。2 $\mu$ DNAの複製機能を持った多コピーベクターに高発現プロモーターを組合わせたベクターは酵母の有用形質の発現促進に有効であるばかりでなく、有用異種タンパク質の高生産にも大きく寄与している。

### 3. 有用酵母の分子育種の展開

上に述べた酵母に特徴的な分子育種技術を駆使し、異種遺伝子の導入あるいは酵母に既存の遺伝子の発現調節により、いくつかの有用株を作出する試みがなされた<sup>5)</sup>。異種遺伝子導入の例として清酒酵母では、*Saccharomyces diastaticus*や麴菌等のアミラーゼ遺伝子を高発現させ、酵母のみで糖化とアルコール発酵を行わせることによる酒造工程の簡易化が図られ、ビールでは香味に好ましくない成分であるジアセチルの生産抑制のため*Acetobacter aceti*等の $\alpha$ -アセト乳酸脱炭酸酵素遺伝子を導入した株が開発された。酵母の既存遺伝子の発現調節としては、香気成分生成遺伝子の発現促進あるいは抑制が図られてきた。その例として、ロイシン合成系遺伝子の多コピー導入による高発現によって、その代謝産物であるイソアミルアルコール生産性の向上、フィードバック阻害のかからない変異型のフェニールアラニン合成系酵素の導入による $\beta$ -フェネチルアルコール生産性の向上、硫化水素生成抑制遺伝子の導入によるビール酵母の硫化水素生産の低減化等が挙げられる。また、アルギニンを分解しウレア生成酵素であるアルキナーゼ遺伝子を部位特異的に破壊し、酒質にとって不都合なウレアを生産しない酵母も育種された。

DNAの*in vitro*の操作技術はPCRを含めほぼ完成の域に達していると言えよう。このようなDNA操作技術と酵母における高度な形質転換技術の融合によって、実用酵母に既存の有用形質の発現促進あるいは不利な形

質の抑制・削除が、高い自由度で可能となって来つつあり、今後この方法を利用した育種がさらに展開することが期待される。

### 4. 有用酵母の環境適応より発現する遺伝子の検索とその機能の解明

有用酵母の生産現場での環境は、実験室内での限られた条件に比べ極めて多くの要因が関与しており、はるかに複雑である。例えば酒造関連酵母は高濃度の糖あるいはエタノール存在下で、しかも乳酸による低pHおよび低温下に置かれる。また、培養方法も静置培養である。これらは通常の実験条件にはない、いわば異常環境である。実験室の限られた条件に比べて、生産現場で見られる酵母の表現型は、はるかに豊かであると想像される。このような環境に適応して多くの遺伝子の発現が調節されていると思われるが、中にはこれらの異常環境ではじめて発現が開始あるいは停止する遺伝子も存在するであろう。これらの特殊環境に適応して、それぞれ特異的に発現する遺伝子を検索し、それをゲノムシーケンスと対応付けることによって、表現型が不明であったORFの機能を解明する手がかりの得られることが期待される。具体的には各環境で特異的に発現してくる転写産物をcDNAとすることから始まり、その一部のシーケンシングとゲノムのデータベースとの対応付けによる全シーケンスの解明を行う。同時に該当する遺伝子を破壊した際の表現型も検討する。さらに、ゲノムシーケンスのデータから推察されるアミノ酸配列から、当該タンパク質の構造と生化学的機能を推察する。その機能を一気に解明することは困難であるかもしれない。しかし、この一連の研究によって酵母の生育過程で、これまで直接は見られなかった新たな因子を遺伝子レベルで見ることが可能となり、中に実用にとっても重要な因子が存在する可能性もある。また、そこで検索された各遺伝子のプロモーターはそれぞれの環境でオン・オフ制御をしているものであり、それらを特定の条件でのみ発現可能なスイッチとして用いることも考えられ

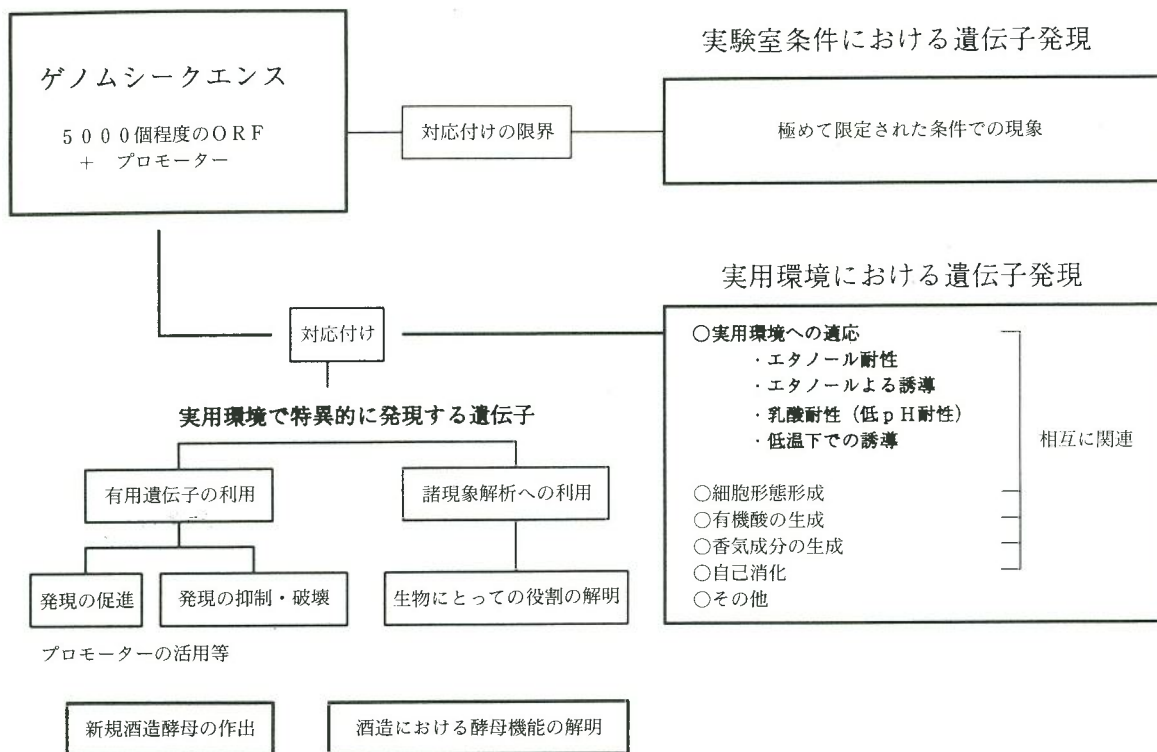


図1 有用酵母研究の一方向

る。(図1)

### 5. ポストシーケンスでの有用酵母の研究例

ゲノムシーケンスのデータベースが酵母における有用形質の分子レベルでの解明に活用されている一例として、筆者らが進めている細胞壁マンナンタンパク質の構造解析<sup>6)</sup>を紹介する。

有用酵母に見られる「泡なし」、「凝集」等の重要な表現型は酵母細胞表層の性質に起因している。それらの機構を分子レベルで解明し、細胞表層の性質を制御することは酵母の効率的利用にとって重要であると考えられる。そこで、細胞表層、すなわち細胞壁の構造および構築機構の解明を進めている。

酵母の細胞壁の構造としてグルカンが細胞膜側に、マンナンタンパク質がその外側に存在するモデルが提唱されており、最外層としてマンナンタンパク質の構造が当面の問題となるが、これまでの研究はその糖鎖部分に関するものが大部分であり、コアタンパク質に関する知見はきわめて少なかった。

筆者らは独自に開発したラロバクター・ブ

ロチアーゼ I (RPI) を *S. cerevisiae* の細胞壁標品に作用させると、複数の特定のタンパク質が遊離することに着目し、可溶化するマンナンタンパク質を同定し、遺伝子工学的手法によってその構造を明らかにした。それらに一つが分子量4万のマンナンタンパク質(gp40)で、1モル当たり48モルもの多量のマンノースを含むものであり、その前駆体をコードする遺伝子をクローニングした。この遺伝子(CWP1)はその塩基配列からアミノ酸239個からなる分子量24,267のタンパク質をコードしており、酵母の細胞表層タンパク質として報告されている他のタンパク質と同様、その中間部分はセリンが極めて多い特徴を有していたが、アミノ酸配列のホモロジーはなく新規のタンパク質であった。次にCWP1タンパク質とホモロジーのあるタンパク質をデータベースから検索すると、そのC末端はSRP1およびTIR2と呼ばれるタンパク質のC末端とホモロジーがあることがわかった。データベースではSRP1タンパク質はグルコースの存在で誘導されるセリンリッチなタンパク質であるが、その所在と機能は不明であり、TIR2タンパク質は低温シ

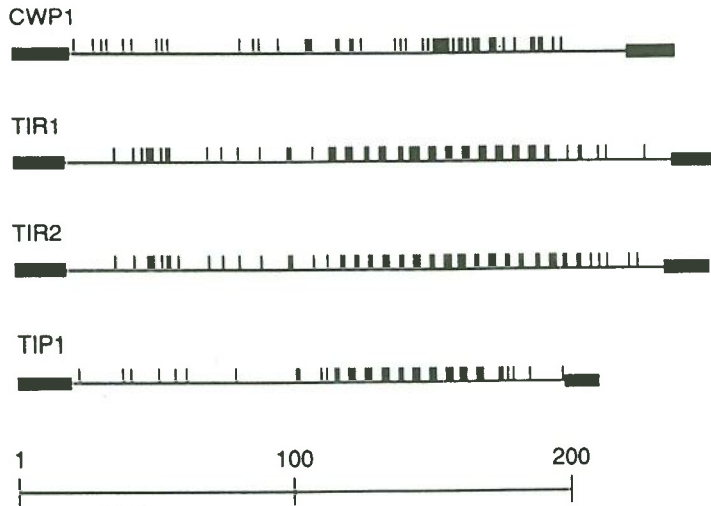


図2 酵母細胞壁タンパク質の新しいファミリー CWP1 タンパク質とその関連タンパク質を示す。黒四角の部分は N末端およびC末端の疎水性配列を示し、垂線はセリンの位置を表す。下部の目盛はアミノ酸の数を示す。

ヨックで誘導される TIP 1 タンパク質のホモログとして取得されたものであることがわかる。図2に示すように、これら4種類のタンパク質の構造を比較すると、何れもN末端およびC末端の両方に膜貫通ドメインを形成できる疎水領域が存在し、グルコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカータンパク質と推察されている。実際にC末端の疎水性の配列を除去すると、このタンパク質は培地中に分泌されることから、細胞壁への組込みにはこのアンカーリングが不可欠であることがわかった。これらのタンパク質はセリンリッチであることが共通しており、これまで報告されている細胞壁タンパク質に比べ小さな分子量を持っており、新しいファミリーの細胞壁構成タンパク質であると考えられる。現に筆者らは TIP 1 が細胞壁タンパク質であることを示す結果を得ている。さらに現在、

これらの細胞壁タンパク質遺伝子の発現が実用環境に応じて大きく変化することもわかりつつある。

これはデータベースから細胞壁タンパク質を類推し、それが現実に細胞壁に存在した一例であるが、このような研究を進めることによって有用形質とゲノムシーケンスから推察される機能との対応付けが可能となる。

### 3. おわりに

実用酵母が活躍する生産現場は同時に酵母表現型の宝庫といっても過言でない。これまで実用段階で興味ある現象が発見されても、遺伝子レベルでその機構を解析する手段がなく見送られた場合もあったが、酵母の分子遺伝学および遺伝子工学の進歩を背景にそれが可能な時代にさしかかっている。ゲノムシーケンスと生産現場で見られる表現型との対応付けによって実用酵母研究の新たな展開が期待される。

### 文 献

- 1) 第17回酵母の遺伝学と分子生物学に関する国際会議要旨集 yeast, Vol.11, Special Issue (1995)
- 2) Rothstein, R. J. (1983) *Method in Enzymol.*, 101: 202
- 3) Burke, D. T. and M. V. Olson (1991) *Method in Enzymol.*, 194: 251
- 4) Rine, J. (1991) *Method in Enzymol.*, 194: 239
- 5) 飯村 穰 (1992) 清酒酵母の研究, '80年代の研究, p.67, 清酒酵母研究会編
- 6) Shimo, H., Y. Iimura and T. Obata (1995) *J. Biochem.*, 118: 302

# 植物のバイオテクノロジー

## ～10年の展開と今後の展望～

農林水産省 農業生物資源研究所 細胞育種部

大澤 勝次

特別な注目を集めるようになって十数年、植物バイオテクノロジーは、この間の数多くの成功や失敗の中からその実像が見えてきたが、未だに多くの誤解や錯覚もゆきわたっている。この度、生研機構設立10周年特集を機に、この技術開発の渦中にいた筆者の事実認識と今後の展開方向の考え方を示して、諸氏のご批判を仰ぎたい。

### 1. はじめに

私達は日常的に植物バイオテクの成果に浴しているが、ほとんどの人はそうと気づいていない。例えば昨日食べたジャガイモやイチゴにはウイルスフリー苗が用いられ、玄関のファレノプシスや机の上のミニバラ、庭に咲くサフィニアの増殖にはバイオテクが用いられ、ユリでは胚培養、イネでは薬培養による新品種が相次いで誕生しているのである。

しかし、10年前の植物バイオテクへの期待はもっと大きかったと言うべきだろう。ジャガイモとトマトの細胞融合で育成された‘ポマト’の話や、遺伝子組換え技術で育成された病気に強いトマトの話が大きな期待を抱かせたからである。はたしてこの10余年、植物バイオテクは何を生み出し、何を生み出さなかったのだろうか。それは事実を冷静に見つめることで自ずと見えてくるはずである。

### 2. 植物バイオテクが生み出してきたもの ～役に立つバイオテクがここにある～

これまでの植物バイオテクが生み出してきたものや期待はずれだったものについて、詳しくは筆者の著書<sup>1)</sup>等を参照していただきたい。ここではこの2年間にその実力が明確になり、それぞれの地域農業の振興に現実的な力を発揮しようとしている府県における最新の成果

を5つだけ紹介して、「役に立つバイオテクがここにある」ことを知っていただきたいと思う。例えばそれは、①高級洋ラン‘バンダ’の簡易大量増殖法の開発（滋賀農試、北村ら）、②胚培養による花粉がほとんどでないユリ‘月光の舞’の育成（岡山農試、森本ら）、③花粉培養を利用した紅色系守口ダイコンの新系統育成（岐阜農総研、杉本ら）、④ソマクローナル変異を利用した低温肥大性メロンの育成（茨城生工研、江面ら）、⑤非対称細胞融合による複合耐病性台木ナスの育成（大阪府農技セ、岩本ら）である<sup>2)</sup>。表1および図1にその概要を示したが、これらの成果はバイオテクを活用したことによって初めて誕生したものなのである。もちろん、植物バイオテクが生み出してきた成果は、他の府県、民間研究機関も含め数多く、この5例はその一端に過ぎないが、筆者はこのようなバイオテク研究と成果こそ高く評価したいのである。いまだに遺伝子組換え技術のみがバイオテクだと思っている人がいたら、この機会に是非認識を改めてもらいたい。そして、これらの手ごたえのある成果が、①目標を明確にし、その目標にふさわしい「材料の選定」に万全を期し、②目標の解決に最も適切なバイオテク技術を選定して、粘り強く取り組み、③地域農業の振興に役立てるという強い信念を持ったマンパワーによって生まれていることを明記しておきたい。

Oosawa Katsuji

表1 府県の植物バイオテクノロジーが生み出した最近の主要成果とその概要

主要成果名(手法) 開発場所 担当者名	成果の概要及びポイント
①高級洋ランパンダの簡易大量増殖法の開発(メリクロン) 滋賀県農業試験場 北村治滋	貴重な親株を損傷せずに増殖させるため、花茎の腋芽培養法を体系化し、培地にはジャガイモの煮汁を用いることで簡易化してバイオテックを農家の庭先で使える技術にしている。
②花粉のほとんど出ないユリ「月光の舞」の育成(胚培養) 岡山県バイオテクノロジー研究所 森本泰史	シンテッポウユリ(♀)×スカシユリ(♂)の雑種の胚培養で育成した後代に花粉レスのユリを見出し、クリーム色の上品な花色と共にその実用性を評価し「月光の舞」として品種登録申請中である(図1)。
③紅色系守口ダイコンの固定と新系統の育成(花粉培養) 岐阜県農業総合研究センター 杉本和宏	白色守口ダイコンと共に紅色守口ダイコンの固定系統を育成する目的で守口ダイコンの花粉培養を行い、F <sub>1</sub> 育種法による固定系統を得た。選抜系統は色、形、長さ等実用性高い(図1)。
④低温肥大性ネットメロン新系統の育成(培養変異) 茨城県生物工学研究所 江面 浩	培養変異の出現頻度の高いメロンの不定胚培養系を用い、低温発芽性による1次及び2次選抜を行い、自殖して形質の固定で回り、F <sub>1</sub> 育種により低温肥大性メロンを育成した(図1)。実用性高い。
⑤複合耐病性台木ナスの育成と採種量の向上(細胞融合) 大阪府農業技術センター 岩本 嗣	ナスの台木アカナスと青枯病抵抗性台木カレヘンの細胞融合によって、青枯病と半身萎凋病に抵抗性で接木親和性に優れた新台木ナスを育成した。採種量も普及レベルに向上している。実用性高い。

文責 大澤勝次(1996.7.25)

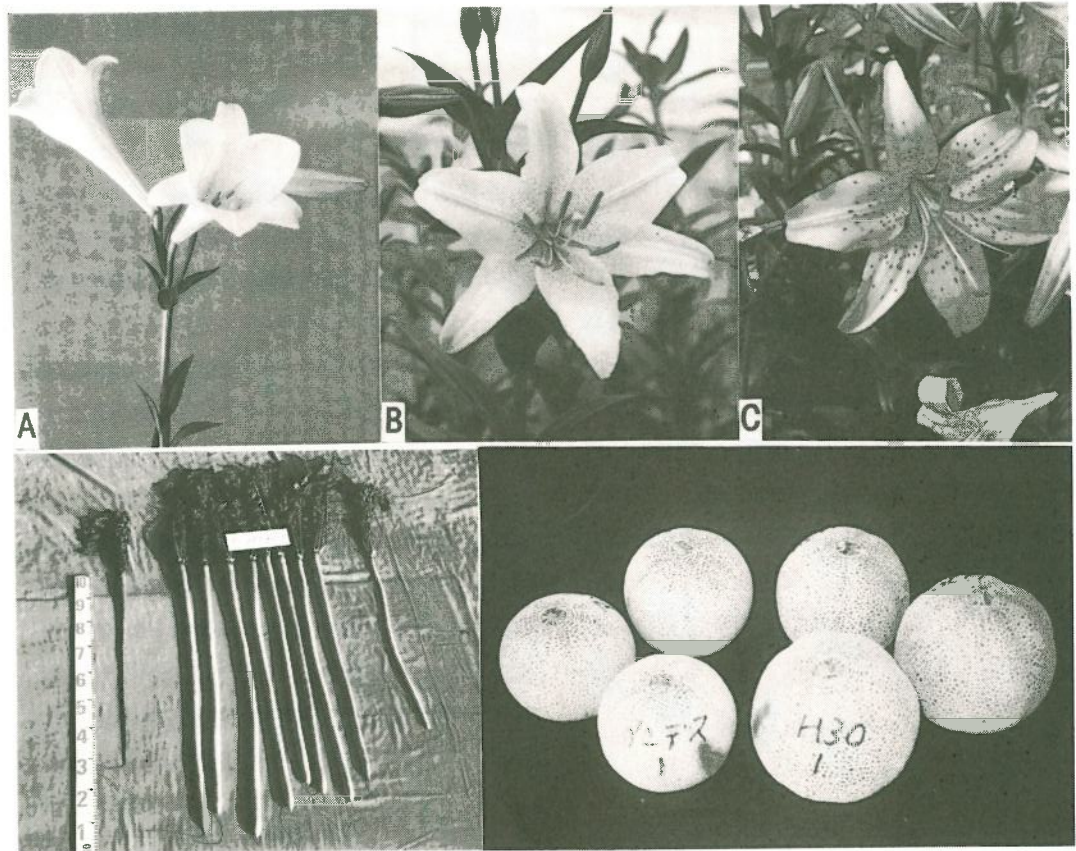


図1 役に立つバイオテクノロジーの成果がここにある  
上 : 花粉レスのユリ「月光の舞」(B)とその両親(A:シンテッポウユリ, C:スカシユリ)  
下左: 花粉培養由来両親(両端)より作出した新系統紅色守口ダイコン(中央の8本)  
下右: アンデスメロンの培養変異「低温肥大性メロン」の選抜系統(右の3個)

3. 国のバイオテック研究が進めてきたもの

～広がりのあるバイオテックがここにある～

我が国の遺伝資源研究と植物バイオテック研究

の中核機関となるべく1983年12月に農業生物資源研究所が設置されてから12年余が経った。この間、数多くの作物における細胞培養技術を開発し、遺伝子解析手法を進展させてきた。



最近ではイネゲノムプロジェクトの推進母体になるとともに中核的研究拠点 (COE) 育成機関として「植物ゲノム機能の解析」に力を注ぎ、世界の注目を集める成果を相次いで発表している<sup>3,4,5)</sup>。

農研センターや各地域の育種工学研究室を中心に多様な役割を担っている国のバイテク研究の全体像を要約するのは困難であるが、ここでは農業生物資源研究所の最新の成果を3点紹介しながら、国のバイテク研究の役割について考えてみたいと思う。

①病原菌の侵入に対する植物の防御反応に関わる新しい遺伝子 (WIPK) の発見

植物には病原菌の侵入などによる何らかの傷に反応する防御機構が知られていたが、抵抗性遺伝子研究室の大橋室長らは、1995年にその防御に関連する新しい遺伝子を発見した。それは傷によって1分以内に誘導される、一種のリン酸化酵素を作る遺伝子であった (表紙)。傷によってこのように速い活性化を受ける遺伝子は動植物を含めて、これまでに全く知られておらず、彼らはこの遺伝子を WIPK (Wound-Induced Protein Kinase; 傷で誘導されるタンパク質リン酸化酵素) と名付けたのである<sup>6)</sup>。この遺伝子はただちに特許出願された。また、この遺伝子を導入した形質転換タバコを用い、植物の病傷害抵抗性の発現と WIPK 遺伝子との関係に関する新事実を相次いで明らかにしてきた。この成果は今後の植物病害抵抗性の機構解明の強力な武器になるものである。

②イネいもち病抵抗性遺伝子 Pi-b の高精度連鎖地図の作成

これまでの我が国のイネの研究蓄積は膨大で、中でもイネいもち病についての研究には多くのエネルギーが注がれてきたが、その本体に迫るには力不足であった。本年7月3日、イネゲノム研究チームのチームレビューにおいて形質遺伝子解析グループから、いもち病抵抗性遺伝子 Pi-b 領域の高精度連鎖地図作りと、9個のコスミドクローンによって Pi-b 領域のコスミド整理地図が完成したとの報告があった。詳細は今後の発表を待ちたいが、

20,000個体に及ぶ F<sub>3</sub> を材料に用いて、文字どおり地をはうような努力によって、いもち病抵抗性遺伝子の本体の1つを追いつめることに成功したのであり、刑事物ドラマを見るようなスリルがあった。いよいよ Pi-b 遺伝子の単離が射程内に入ってきたと言えよう。

③イネキチナーゼ遺伝子を導入した灰色かび病抵抗性キュウリの作出

微生物機能利用研の西澤らが単離したイネのキチナーゼ遺伝子を用いて、全国各地でその遺伝子導入による菌類病抵抗性植物作りが進められ、イチゴではうどんこ病抵抗性個体の作出が報告されている<sup>7)</sup>。最近になって遠縁雑種研の田部井らは、自ら開発したキュウリの細胞培養系にキチナーゼ遺伝子を導入し、沢山の再生キュウリの中に明確な灰色かび病抵抗性の個体を見出し (図2)、その次世代における抵抗性の遺伝と抵抗性の発現機作の新知見を報告した<sup>8)</sup>。抵抗性発現のレベルに大きな差のある形質転換体が多数得られているので、この素材を用いて、導入遺伝子と病害抵抗性発現の仕組みの解明が大きく前進するものと期待される。

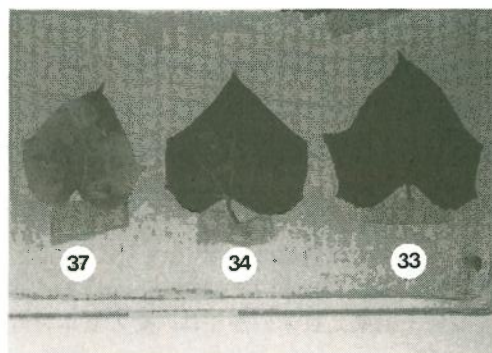


図2 イネキチナーゼ遺伝子を導入したキュウリ‘霜不知’には抵抗性発現レベルに明確な差がある  
37:り病性, 34:中間, 33:抵抗性  
(田部井ら, 1996)

わずかに3例の、ごく最近の事例のみであるが、国のバイテク研究の役割が将来に「広がりのあるバイテク」の技術開発であることを端的に示しているのではないだろうか。

4. 遺伝子組換え植物は今

以上のように、府県からは産地に依拠した役に立つ成果が誕生し、国の研究機関からは

広がりのある成果が得られているのであるが、昨今の植物バイオテクへの関心は遺伝子組換え植物に集中している観がある。最近は特に、アメリカやカナダで育成された遺伝子組換え植物を用いて、我が国に隔離圃場試験を申請する例が多くなっている。本年7月23日、厚生大臣の諮問機関である食品衛生調査会はバイオテクノロジー特別部会を開き、モンサント社等が申請していた除草剤耐性あるいは害虫抵抗性を有するダイズ、ナタネ、トウモロコシ、ジャガイモなど7品種のすべてが指針に沿って安全性評価が行われているとの部会報告を行った。まだ部会報告が出たばかりの段階であるが、これで我が国でもバイオナタネ油やバイオコーン油が登場する道が開かれることになったと考えてよいだろう。

遺伝子組換え植物の作出を担い、より優れた品種の育成を願ってきた筆者は、これまで育成したメロンでその安全性評価試験の一部を担当し、データも出してきたので、今回の厚生省の答申によって遺伝子組換え植物の食品としての出口が明確になったことを歓迎している。7月23日時点での対象作物は外国産の遺伝子組換え植物ばかりであったが、今後は国産の作物や品種を用いて同様の申請がされることになろう。その場合、誰にも歓迎される優れた性質が付加された作物であってほしいものである。

#### 5. 特許の問題について

遺伝子組換え技術の多くは、その基本特許を外国に抑えられている状況があり、今後、実用化を図る上で大きな問題となると懸念されてきた。我が国では、これまで軽視してきた知的所有権の認識を改め、アイデアや技術の価値を高く評価し、オリジナルな遺伝子の単離や新しい遺伝子導入技術の開発に集中的な取り組みを図る必要がある、すでにその動きは強力に展開されている<sup>9)</sup>。しかし、30年近くにわたって農水省で技術開発の一端を担ってきた筆者らは特許取得には熱心でなかった。日本の国公立の研究機関の基本姿勢が「公開・公表の原則」を貫いてきたのだから、

それは当然だったのである。欧米の特許も実は企業が取得しているのであって国の機関が先頭に立って取得しているわけではない。また、基本特許が押さえられているからといってこの面の技術開発をあきらめるといってはいない。本当に良いものができればそれは特許権者の利益にもなり、応用技術の開発者とも十分に共存できるのだ。また、周辺特許にもいろいろあり、それを押さえることによって基本特許の効力を減ずることも可能なのである。最も大事なのは本当に価値の高いものを作り出すことなのであり、そのようにして戦後の特許戦争を乗り越えた自動車産業の具体例から多くを学ぶべきであると思う。

#### 6. 植物バイオテクノロジーの展開方向

このような現状認識を踏まえたうえで、今後10年間の植物バイオテクノロジーの展開方向は次の3つであると考えられる。

##### (1) 誰もが納得する価値の高いバイオテク産物をつくること

植物バイオテクによる新作物づくりはこれまで10余年の「助走期間」を終わった。今後の10年間に植物バイオテクは誰もがその価値を納得し、その実力に「さすが」となるような作品を作らねばならない。そして、それを可能にする技術的な蓄積はすでにある。私達は植物の増殖、保存、育種のすべての面でこの技術を駆使できる段階に入ってきているのだ。あとは目的を明確にし、そのための素材と手法とを的確にしぼり込むことである。例えばそれは次のようなものである。

- ① 絶滅の危機に直面している希少植物の大量増殖や保存技術の開発
  - ② 高齢者やアレルギー疾患等を持つ人のための高機能性食品等の開発
  - ③ 産地の個性化の時代における特徴ある地域農産物の高付加価値づくり
- ##### (2) 植物バイオテクノロジー研究戦略の新展開を図ること

これまでの植物バイオテクは生きた細胞の分化全能性に依拠して進展してきた。しかし、現在の遺伝子組換え技術は、導入した遺伝子

が染色体のどこにどのような状態で導入されるのかは不明で、行き当たりバッタリの技術であると言っても過言ではない。また、これまで作られている遺伝子組換え植物はいずれも1, 2の遺伝子導入による単純な機構のものばかりであり、その先に進むには大きなカベがあることを認識すべきである。生きた細胞が日々営んでいる見事な情報伝達の仕組みを、私達はまだまだほんのわずかしか学んでいない。生きた細胞から学ぶことはまだまだ極めて多いのである。例えばそれは次のようなものである。

- ①これまでの行き当たりバッタリ方式の組換え技術を脱してジーンターゲットングや相同組換え技術等を利用した新しい遺伝子組換え技術のシステムを開発する<sup>10)</sup>。
  - ②細胞間の情報伝達機能に重要な役割を果たしていることが相次いで知られてきた糖鎖などの研究を推進して、その巧みさに学ぶ。
  - ③植物ゲノムの構造の解明を一層推進して、その構造と遺伝子発現との関係を明らかにし、多くの有用遺伝子を単離してその機能発現の仕組みを明らかにする。
- (3) 植物バイオテクノロジーが特別扱いはされる時代を終わらせること

30余年以上の歴史のあるいわゆるオールドバイテクの成果物(例えばウイルスフリー苗やラン等の大量増殖苗など)はすでに特別扱いを受けていない。評価されるか否かはその産物が良いか悪いか、価値があるかないかなのである。現在特別扱いされている遺伝子組換え植物などをはじめとするバイテク植物も、10年後には特別扱いを受けず、その産物が真に価値が高いかどうかで評価されるようになるだろう。

- ①バイテク体験などを通して植物バイテクのありのままを身近に感じてもらう機会を多くつくる。
- ②知的所有権や特許権についての認識を強め、アイデアや開発した技術の権利保護の大切さについての理解を高める。

- ③農耕をルーツとするバイオテクノロジーを、「生命の畏敬の科学」として推進し、緑豊かな21世紀の地球修復のために活用する。

## 7. おわりに

今一度私たちの身のまわりの生きものに目をうつすと、この地球上に生きている生きものたちの何と多様であり変化に富んでいることか。自分自身でさえ、昨日と今日は異なり、今日と明日も同じではない。それが生きているということであり、生命というものだと思う。昨今の原子力発電等における解決不能の廃棄物処理に見るように、人類が到達した科学技術の総力をもってしても、動植物の生きた細胞達が日々簡単にやっつけているエネルギー代謝の足元にも及ばないのが現実なのである。このことを想うとき、自然への畏敬の念でいっぱいになる。そして「生きた細胞を生きたままで扱う」植物バイオテクノロジーが拓く可能性の広大な前途に確信を持つのである<sup>11)</sup>。私達は謙虚に、あくまで謙虚に、生きた細胞達の声に耳を傾け、彼らの発している情報をキャッチする努力を続けなければならない。そしてそのことが、人類だけでなく多種多様な生物達にとっての、住み心地の良い21世紀の地球を、緑豊かに確保することにつながるのだと信ずる。

## 文 献

- 1) 大澤勝次 (1994) 図集植物バイテクの基礎知識, pp.250, 農文協
- 2) 大澤勝次 (1996) 農林水産研究ジャーナル 19(4) : 6-8
- 3) Takatsuji, H. *et al* (1994) *Plant Cell*, 6 : 947-958
- 4) Sano, H. and Y. Ohashi (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92 : 4138-4144
- 5) Nakamura, Y. *et al* (1996) *Planta*, 199 : 209-218
- 6) Seo, S. *et al* (1995) *Science*, 270 : 1988-1992
- 7) 浅尾浩史 (1996) 農林水産研究ジャーナル 19(4) : 34-38
- 8) 田部井豊ら (1996) 第5回植物細胞分子

- 生物シンポジウム要旨集 p.64  
 9) 杉田耕一ら (1996) ブレインテクノニ  
 ース 56:5-7  
 10) Gu, H. *et al* (1994) *Science*, 265:6103-

6106

- 11) 西尾敏彦ら (1996) バイオテクノロジーの  
 農業哲学, pp.256, 農文協

総 説

## 動物のバイオテクノロジー ～10年の展開と今後の展望～

近畿大学農学部

角田 幸雄

発生工学, 細胞工学, 遺伝子工学や分子遺伝といった10年前にはみられなかった研究が活発に行われるようになってきた。この間, 牛の胚移植技術は実際の繁殖技術として定着し, 体外受精や産子の性支配も可能となった。クローン牛やトランスジェニック家畜の作出も現実のものとなりつつある。21世紀を目前にして, 新しい動物生殖技術を開発しようとする研究の息吹が感じられる昨今である。

本年(1996年)と10年前の1986年に開催された日本畜産学会の講演内容を比較してみると, 10年間の歩みをふりかえってみたい。1986年の第78回大会は, 農林水産省畜産試験場の主催のもとに筑波研究学園都市で, また, 1996年の第91回大会は名古屋大学農学部でそれぞれ開催された。表1に, 各分野ごとの発表演題数と全体に占める割合を示した。これをみると, 各分野ごとの割合は両

表1 1986年度(第78回)と1996年度(第91回)  
 日本畜産学会における一般講演内容の比較

分 野	演題数(割合)	
	1986年度	1996年度
繁殖	84(20)	72(14)
栄養・飼料・飼養	125(30)	125(24)
生理	39(9)	41(8)
解剖・形態	21(5)	24(5)
畜産物利用	63(15)	75(14)
遺伝・育種	52(13)	81(15)
経営・管理・草地	28(7)	58(11)
衛生		
バイオテック	—	47(9)
計	412	523

TSUNODA Yukio

大会間で大差が見られず, 1996年にはわずかに栄養関係と繁殖関係の演題が若干減少しているにすぎない。これは, 本年度新しく設けられたバイオテック分野に分類された演題が多かったためと思われる。なお, このバイオテック分野には従来遺伝・育種分野に分類されていた演題も多く含まれている。本年度の学会では, 発生工学, 細胞工学, 遺伝子工学や分子遺伝といったキーワードが使用されている点が10年前とは大きく異なっている。本稿では著者が気づいた10年間の変化について述べてみる。

### 1. 胚 移 植

1964年に, 手術を伴わない非外科的方法による胚移植によって世界に先がけて子牛が生産された(杉江)<sup>1)</sup>。この技術は, 年とともに注目を集め, 1986年には1,400頭弱の子牛が得られている。その後, 実際の繁殖技術として急激に発展をとげ, 1996年には1万2千頭をこえる子牛が胚移植によって生産されるようになっている。

### 2. 体 外 受 精

と場から採取した卵巣から未成熟卵子を回

収し、体外で成熟させた後体外受精を行い、受胎雌に移植して初めて子牛が得られたのは1985年のことである(花田ら)<sup>2)</sup>。当時は牛胚の体外培養技術が確立していなかったため、体外受精卵を一時的にウサギの卵管へ移植して発育させる方法がとられていた。その後、培養技術の改良に伴って体外で受精直後から胚盤胞期まで培養できるようになり、実際の繁殖技術として使用されるようになってきている。体外受精卵の移植によって得られた子牛は、1993年度には1,700頭をこえるようになってきている。

### 3. 性支配

種々の方法を用いて、X染色体をもつ精子を分離して人工授精し、産子の性をコントロールしようとする研究が行われてきているが、家畜ではまだ確立された技術とはなっていない。そのため、胚移植の前に胚の性を判別して、得られる産子の性をコントロールしようとする試みが行われている。1986年の時点では、胚から少量の細胞質を採取したり、あるいは2個に切断後染色体検査を行ったり、H-Y抗体(組織適合Y抗原に対する抗体)を用いる方法が行われていたが、成功率や的中率が低い場合もあり実用化されるには至らなかった。最近では、Y染色体に特異的なDNA塩基配列をプライマーとして、胚から採取したごく少量の細胞中の相補的DNAを増幅させるPCR法を応用し、胚の性判別が比較的容易にまた確実に実施できるようになった。現在、PCR法を用いて胚の性判別による雌雄産み分け技術を実用化技術として定着させるため、各都道府県試験研究機関を中心に実証試験が行われている。また、本法の実施に必要なプライマーを含む試薬類はすべて市販されており、さらに胚の性判別を受託して行う企業も現れている。

### 4. 核移植

核移植を畜産で実施する最大の目的は、クローン家畜を生産することである。哺乳動物における確実な核移植の成功例は、1983年に

(McGrath and Solter)<sup>3)</sup>発表されたマウス前核期受精卵間での前核の置換である。この技術が家畜胚に応用され、初期分割期胚の核を染色体をあらかじめ除去した未受精卵に融合して発生させ、受胎雌に移植することによって1986年に羊(Willadsen)<sup>4)</sup>、1987年に牛(Pratherら)<sup>5)</sup>でそれぞれ産子が得られた。我が国においては、1985年(角田ら)<sup>6)</sup>にマウスの前核置換成功例が報告され、1990年になってようやく牛胚の核移植で産子が得られている(牛島ら)<sup>7)</sup>。

1992年頃からいくつかの試験研究機関で牛胚の核移植による産子の生産例があいついで報告され、本年6月の農林水産省家畜改良センターの調査では、これまで113頭の子牛が生産されている。

現在最も広く採用されている牛胚の核移植法は次のとおりである。すなわち、体外受精で作出した、あるいは過剰排卵牛より採取した桑実期までの発育ステージの初期胚の割球をばらばらにしてドナー核(割球)として用いている。これを、あらかじめ染色体を除去後単為発生刺激を与えた未受精卵(レシピエント卵細胞質)の囲卵腔に注入し、電気刺激を与えてドナー核とレシピエント卵細胞質を融合する。ついで、融合卵を体外で胚盤胞期まで発育させ、そのまま受胎雌へ移植するかあるいは凍結して保存する。このような方法によって、1個の胚から5~10個の胚盤胞が得られるようになってきている。さらに、核移植胚がある程度発育した時点で再度単一割球に分離して次回のドナー核として用い、このような操作を3回くり返すことによって1個の胚から最大43個の胚盤胞が得られている<sup>8)</sup>。

また、クローン胚を受胎雌に移植することによって、これまで最高6頭のクローン子牛が得られているが、その内1頭は死産であり、また3頭は分娩後へい死している。これまでのところ、一卵性双子や3つ子は数例ずつ得られているが、これ以上の数のクローン子牛を確実に生産する技術には諸外国と同様に我が国でもまだなっていない。

## 5. 遺伝子導入

10年前とは異なって、遺伝子工学的手法を用いてクローニングされた特定の遺伝子を用いて受精卵へ導入して染色体に組み入れ、受胎雌へ移植することによって導入遺伝子が発現するトランスジェニック (TG) 動物を作出する研究が活発に実施されている。

### a) 家畜の育種・改良, 有用物質の生産

欧米諸国では、異種の遺伝子を導入して、①繁殖性, 増体性, 抗病性や飼料効率などの面から家畜を育種・改良する目的で、あるいは②有用生理活性物質を主として乳汁中に作らせる目的でそれぞれ実施されている。我が国では、供試する家畜数が限られていることもありこの分野の研究は遅れていたが、1993年になってようやく活性化 *ras* 遺伝子を導入した TG ブタが作出された (山川ら, 未発表)。最近では、ヒトの臓器移植のための臓器提供用 TG ブタの作出も注目を集めはじめています。また、1988年に卵殻がまだ形成されていないニワトリの卵子を体外にとり出し、操作し、さらに個体へ発生させることに成功して以来 (Perry)<sup>9)</sup>、ニワトリにおける遺伝子導入の研究も活発に開始されだしている。

### b) 実験動物における研究

遺伝子の役割を解明したり、ヒトの疾患モデル動物を作出する目的で実施されている。特に後者では、多能性をもつ継代培養細胞である胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いて、*N-mic*, *fyn*, *src*, *abl*, *c-mos* などの遺伝子を欠失した数多くのマウスが作出されており、生体内におけるそれらの遺伝子の役割が解明されようとしている<sup>10)</sup>。

## 6. 分子遺伝

畜産の経済形質の大部分は、その発現に環境要因が大きく影響する量的形質であることから、これまでは量的形質の表現型値をもとに統計的分析法を用いて家畜の選抜・育種が行われてきた。量的形質は、個々の効果は小さい多数の遺伝子 (ポリジーン) によって支配されている。そこで、重要な経済形質を支

配していると考えられるポリジーンと連鎖しているタンパク質多型や DNA 多型などの、遺伝子マーカーに基づく分子遺伝的選抜を行うための、基礎的研究が進められようとしている。

## 7. 今後の展望

1952年に家畜の精子を凍結保存できることが発表されて以来、凍結精子を用いた人工授精技術が広く普及するようになり、家畜、とくに乳牛の育種・改良が大きく進んできた。1964年に世界に先駆けて我が国で開発された牛胚の非外科的移植技術は、改良が重ねられながら、新しい付加価値をもつ技術が次々とあいついで開発されてきた。その結果、1994年には世界各国で38万頭をこえる子牛が生産されるようになってきた。近年進歩の著しい核移植技術は、今後ますます技術改良が進んでいくことと思われる。しかしながら一方で、発生の進んでいる核を一旦受精直後の状態に戻す”初期化”という操作を行うことが一因と思われるが、流産率や分娩後の産子の死亡率が高かったり、産子が異常に大きい場合があるなどの問題点が明らかになってきている。家畜はもとより、実験動物においても、着床前の初期胚の遺伝子発現機構については分析材料が限られていることからほとんど手がつけられていない。しかしながら、これらの機構が明らかになるにつれて、おそらく核移植に伴う種々の問題点も解決されていくものと期待される。

精子、卵子、胚の研究の次にくるのは、おそらく個体への発生能力のある継代培養細胞を対象とした研究と思われる。本年、羊の胚盤を継代培養し、その細胞核の核移植によって子羊が生産されている (Campbellら)<sup>11)</sup>。近い将来、継代培養細胞の核移植によって栄養生殖的に多数のクローン家畜を作出したり、始原生殖細胞を体外培養後、必要に応じて減数分裂を開始させて精子や卵子を形成させ、有性生殖を行うといったようなことが可能となるかも知れない。

以上、著者の独断と偏見に基づいて動物バ

イオテクノロジー10年の展開についてまとめてみた。

文 献

- 1) Sugie, T. (1965) *J. Reprod. Fert.*, 10 : 197-201
- 2) 花田 章 (1985) 家畜繁殖誌, 31 : 56-61
- 3) McGrath, J. and D. Solter (1983) *Science*, 220 : 1300-1303
- 4) Willadsen, S. M. (1986) *Nature*, 320 : 63-65
- 5) Prather, R. S. *et al.* (1987) *Biol. Reprod.*, 37 : 859-866
- 6) 角田幸雄ら (1985) 家畜繁殖誌, 31 : 130-134
- 7) Ushijima, H., T. Etoh and Y. Tsunoda (1991) *Theriogenology*, 35 : 287. abstr.
- 8) Takano, H. *et al.* (1996) *Theriogenology*, submitted
- 9) Perry, M. M. (1988) *Nature*, 331 : 70-72
- 10) 山村研一・勝木元也・相沢慎一 編 (1994) マニュアル 疾患モデルマウス. 中山書店
- 11) Campbell, K. H. S. *et al.* (1996) *Nature*, 380 : 64-66

総 説

## 魚介類のバイオテクノロジー ～10年の展開と今後の展望～

農林水産省 養殖研究所遺伝育種部  
和田 克彦

魚介類のバイオテクを水産動物の遺伝・育種の先端研究と位置づけ、染色体操作や遺伝子研究の最近の進歩を概観した。三倍体や雌性発生や雄性発生のような染色体操作研究の成果の応用は多くの魚種で試みられ、実用化されたものも多い。このような染色体をゲノム単位で操作して育種に応用する方法は農業系生物では、古典的な部類に属するが、水産動物では単性発生やその利用によるクローンの利用等、農業系にない応用の可能性を持っている。遺伝子の研究は、特に実用種で、どの分野でも遅れているが、基礎生物学や他の生物との比較のための実験動物として、最近ゼブラフィッシュやメダカあるいはウニの研究が進んでいる。それらでは、基礎生物学の豊富な蓄積を踏まえて、最新の分子生物学の手法が駆使され、遺伝子の発現調節機構が研究されている。実用種の有用形質関連の cDNA も多くの種の多くのタンパク質やペプチッドでとられるようになった。これらの成果の育種への応用について考察した。

### 1. はじめに

魚介類バイオテク研究の対象は他の農業系生物と比較して、対象種が多様性に富んでいる。水生動物のうち、魚類から分類学の見本のような無脊椎動物まで、実に多彩な種が利用されている。ここ10年の進歩をみると、実用化に至ったものや、研究の進展により今一步というものも少なくない。また、研究面では、実験動物として、下等な脊椎動物としての魚

類が、高等なほ乳類との比較のために注目されているのは遺伝・育種分野も例外ではないようである。例えば、遺伝子の発現等の研究のモデルとして用いられて来たマウスが動物保護運動のあおりで用いづらくなり、メダカやゼブラフィッシュが、特に発生に関する遺伝子の研究に用いられるようになり、魚類の遺伝子研究が進展しているという。一方発生学における転写・修飾など遺伝子の発現に関与する因子の研究のモデルとしてウニ、ゼブラフィッシュ、メダカが用いられるようになるなど、水産動物の遺伝子研究が盛んになっ

WADA Katsuhiko

てきており、魚介類のバイテク研究へ、これらの成果が応用されることが期待されている。

1986年6月フランスのボルドーでFAO主催の「水産における選抜・交雑遺伝育種と遺伝子工学に関する国際シンポジウム」が開かれ、当時の水産の遺伝育種の主要分野のレビューと各国への勧告が行われた。以来10年がたち育種のうちバイテク分野は急速に進展した。国内では、日本水産学会が「水産増養殖と染色体操作」と題するシンポジウムを開催したのが、1989年4月であり、このころから三倍体や雌性発生を中心とした魚介類の染色体操作研究が盛んになった。

ここでは、これら内外の水産バイテク研究の最近10年の発展を振り返ってとりまとめ、併せて今後の展望についてふれてみたい。

## 2. 染色体操作研究

水産動物の多くは、体外受精をするので卵数も多いこともあって、卵に色々な処理をすることにより、1)人為三倍体、2)雌性発生あるいは、3)雄性発生を誘起させる研究が行われて来た。実用面で期待された点は、1)三倍体の不妊効果、2)雌性発生による全雌生産、3)雄性発生による全雄生産、あるいは4)クローン利用による選抜育種等である。おそらく

我が国ほど多彩な魚種で染色体操作研究が展開されている国はないであろう。魚食民族で多くの種を利用しているうえ、染色体研究では他の動物でも我が国は進んでいたこと等が背景にあらうか。

最近10年間で、三倍体と全雌生産については実用化まで進んだ種があるが、全雄生産やクローンの利用は、いずれの種でもまだ研究段階である。三倍体魚介類など染色体操作された種苗を実際の養殖に利用する際、水産庁の指導で「三倍体魚等の水産生物の利用要領」による水産庁長官の特性評価の確認が行われている。その関係で、実用化にむけて試験申請が出された事例を、表1に示した。この表の他に、多くの種類で染色体操作研究が行われている。

三倍体については、実際の生産現場で大量に生産するためには、受精卵をその都度処理（魚類では温度ショック、貝類では薬剤—カフェイン—処理）をしなければならず、コスト面で実用化の制約となっている。最も早くから染色体操作の実用化が進んだ英国のニジマスでは三倍体生産は、発眼卵生産の30%程度であるという。三倍体雄は成熟する魚種が多いので、全雌三倍体として利用される場合が多い。また二倍体受精卵の処理法では100

表1 「三倍体魚等の水産生物の利用要領」による特性評価の確認実績

(1) 確認を行ったもの	
<<平成4年12月14日付け>>	
①全雌三倍体アマゴの種苗生産及び養殖	申請者：岐阜県水産試験場長
②全雌ヤマメの種苗生産及び養殖	申請者：山形県内水面水産試験場長
③ニジマス全雌三倍体の種苗生産及び養殖	申請者：長野県水産試験場長
④全雌ニジマスの種苗生産及び養殖	申請者：滋賀県醒井養鱒場長
<<平成5年8月25日付け>>	
⑤雌性化ヒラメの種苗生産及び養殖	申請者：鳥取県水産試験場長
⑥全雌ギンザケの種苗生産及び養殖	申請者：宮城県内水面水産試験場長
⑦全雌三倍体サクラマスの種苗生産及び養殖	申請者：北海道立水産孵化場長
<<平成6年6月20日付け>>	
⑧広島産三倍体マガキの種苗生産及び養殖試験	申請者：広島県水産試験場長
⑨全雌アマゴの種苗生産及び養殖	申請者：岐阜県水産試験場長
⑩全雌異質三倍体ニジマスの種苗生産及び養殖	申請者：愛知県水産試験場長
(2) 実施計画が適正であると認めたもの	
<<平成5年8月25日付け>>	
⑪全雌三倍体サクラマスの高見人工湖における特性評価	申請者：北海道立水産孵化場長

「水産分野における新技術研究・開発の現状」(水産庁水産ハイテクノロジー開発室 平成6年)による。



%三倍体の集団を生産するのは、個々の卵の発生速度がいつも同調しているわけではないので、事実上不可能であろう。したがって交配親集団としての四倍体の育成が望まれているが、魚類の場合卵割阻止による方法が安定しないこと、四倍体集団の系統維持がやや難しいこと、あるいは四倍体精子の頭部が大きく二倍体卵門を通過できるかという懸念などが示唆されている。しかし最近ニジマス等では四倍体が維持できることがわかってきた。また貝類では、第1および第2極体のいずれも放出が阻止できるので、これらにより四倍体がマガキやムラサキガイで誘起されている。またマガキではごく最近、米国で三倍体卵と二倍体精子との交配から発生した胚の第1極体の放出を阻止する方法で四倍体が育成できること、それらと二倍体の交配（正逆とも）で四倍体が育成可能であること、四倍体同志から三倍体系統を維持できことが報告された。

雌性発生による性の統御は、XY型遺伝的性決定機構を持つ魚類で普及し、遺伝的雌をホルモン処理して雄化し（偽雄とよばれるXX型雄）交配親集団として用いる方法がニジマスで実用化されている。ヒラメでは性が分化する発生時期の環境（水温）等の影響が強いことが解明された結果、染色体操作だけでは性を統御できないことがわかったという。アユでは性転換技術による偽雄生産が難しく全雌三倍体は普及に至っていない。

雄性発生は卵の遺伝子を破壊するためガンマ線等の照射施設が必要なため研究例が少ない。種によってはエックス線や紫外線でも卵核破壊により雄性発生ができることがフナやタナゴ等で報告された。雄性発生や雌性発生は性の統御の他に、選抜育種等の研究のためのクローン作出技術への応用が考えられ、今のところ魚類に限られている。いずれにしても、これらの技術開発には、卵割阻止や精子の融合によるゲノムの倍加が必要で、種によってはこれが困難で、実験的には成功してもまだ普及技術にはなっていない。

魚類のクローン研究は世界でも日本がリー

ドしているといっても過言ではない。外国ではオランダでコイでクローン作成の成功例が報告されている程度で、日本のように、ニジマス、アマゴ、アユ、ヒラメなど多種で成功している国は他にないであろう。クローンの育種への利用は、実用動物では家畜はもちろんのこと戦前ロシアで盛んに研究されたカイコでも実用には至っていない。魚類では、今後の研究の展開に期待される面が多いが、家畜やカイコ等と違い卵の数が多いことや、性転換が比較的容易なため、性が偏る種でも交雑育種法と組み合わせて優良品種育成の有力な戦略になることが期待される。

### 3. 遺伝子操作研究

魚類の遺伝子研究は他の脊椎動物に比較して大変遅れている。ここ10年で水産バイオテクノロジーの流れは染色体レベルから遺伝子レベルへと大きく変わったことは誰も認めるところであろう。しかし遺伝子レベルの研究が、水産育種に実際に導入されるにはまだ時間がかかりそうである。もちろんDNAの研究はあらゆる生命現象に関わっていることがわかりつつあり、DNA研究はもはや遺伝学の分野に限らず、生物を研究する有力な技法となりつつある。水産動物育種分野でも、1) 遺伝的多型の利用、2) 有用遺伝子のクローニング、3) 有用遺伝子の発現調節機構解明、4) 組み換え体作出のための遺伝子導入法開発などがくりひろげられている。基本的には、分子生物学的分析手法の改良発展に支えられて、特に魚類では進展がみられている。

多型検出は農業系生物と同じ考えで進められている。魚介類の場合は、MtDNAの制限酵素切断片長多型（RFLP）を利用するなど、天然資源の管理を目的とした集団解析に用いられるケースが多い。この場合、MtDNAの塩基配列のうちDループとよばれる領域が、変異が豊富であるのでよく用いられる。これに対して核（ゲノム）DNAの塩基配列の中に見られる繰り返し配列を色々な方法で検出する方法が開発され、分析精度が上がってきており、育種分野に応用するこ

とが期待されている。中でも先に述べた魚類クローンの検定にはフィンガープリント法が普通に用いられるようになった。また特定の有用形質と連鎖しているマーカーとして、このような繰り返し配列を検出するマイクロサテライトと呼ばれる変異の研究も始まっている。有用形質との連鎖を利用することは、古典遺伝学の非常に遅れている魚介類では今のところ難しいが、マーカーとして座がわかっている（座特異的）変異がこの方法で多数利用できることが期待されている。

前述のように、魚類では性統御は非常に実用価値が高い。一方、性に関係した分子生物学そのものの研究は、脊椎動物の中でも魚類は多彩な様相を呈しているようで、ヒト等哺乳類といった高等脊椎動物の性の遺伝子を研究する上で格好の比較研究の対象やモデル動物となるようである。サケ科魚類のマスノスケ雄の染色体特異的 DNA がサブトラクション法で決定され、やがてその塩基配列が決定された。その DNA プローブを用いて、稚魚の時期に PCR 法で遺伝的性を判別できるようになったという。前述の全雌生産用交配親としての偽雄は、後代検定を経ないと判別できなかったが、この技術開発により、その代のしかも稚魚で判定できるという（カナダ）。サケ科魚類の性決定は XY 型であるが、ZW 型の性決定をもつ魚種（ブラジル産淡水魚 *Leporinus elongatus*）では、逆に雌特異的な DNA がクローニングされている（日本）。これら性特異的な DNA は、近縁の種ではたとえあっても性特異的ではなく、種特異性が高いようである。

成長や成熟に関連する形質は魚介類の育種にとって重要である。一方発生の過程で発現する様々な遺伝子の研究も種苗生産技術開発が重要課題の魚介類では重要である。これまで研究された遺伝子の中には、このようなものが多い。ただし、遺伝子のクローニングも cDNA が多く、発現調節に関わっている領域の解析は少ない。cDNA に限れば、発生、成長（形態形成）、繁殖（生殖）、免疫に関係ある水生動物の多くの遺伝子がクローニング

されている。進化、系統との関係で近縁、遠縁関係と遺伝子の構造の類似度（保存された領域）の比較が盛んに行われているという。ただし、残念ながら遺伝子と形質の関係を解明し、染色体上のどこに構造領域や発現領域があり、修飾等の因子が何であるかなどのいわゆるゲノムマッピングは、突然変異体や古典遺伝学による遺伝形質の情報の少ない水生動物では非常に限られている。

最近実用魚類の遺伝子研究で参考になる成果が、カナダで報告された。氷点下で生きることのできる魚類（ヒラメ類やゲンゲ類）には抗凍結タンパク質があるが、このタンパク質の構造や cDNA を研究していた研究者がいた。この cDNA やゲノム DNA を単離してその構造（塩基配列やエキソン、イントロンの配列など）やその発現調節機構が調べられた。これらの研究は分子生物学のほかタンパク質科学や組織培養など細胞生物学などの諸専門家が参加したという。次いで水産生物などの専門家が加わり、遺伝子導入実験でこのような遺伝子を持たないサケ科魚類での発現の研究が行われた。この遺伝子導入実験は学問的にはある程度成功しているが、氷点下でも成長するサケ科魚類を作るという育種目標にはほど遠い。しかし、抗凍結タンパク質の遺伝子の発現調節領域（塩基配列）とそれまでによく研究されていたサケ科魚類の成長ホルモン遺伝子の構造領域（これだけでは育種には役立たない）を結合した DNA が、大西洋サケ（研究が行われたバンクーバーのある太平洋側には棲息しない）の卵に導入する実験が根気よく続けられた。Nature に発表されたこの研究成果は成長ホルモンの発現が導入された子孫で認められていることを示している。成長ホルモン遺伝子導入実験は、他の魚類での他の遺伝子の導入実験に関する多くの報告のように発現は不安定で、モザイク（体細胞や生殖細胞＝卵や精子で導入遺伝子の発現が異なる）現象があるようであるが、先にも述べたように、卵数が多いという（サケ科で約数千）魚類の特徴を生かして選抜育種理論を併用すれば、夢の新しいサケ科魚が

育成できるかもしれない。魚卵への遺伝子導入手法はいろいろ改良が試みられているが、実用的な魚種によって効率は異なるであろうから、受精前後の卵の状態に応じた手法の開発はまだこれからであろう。トランスジェニック技法の応用が水産動物の育種に貢献することを祈りたい。

いうまでもなく、モデル動物で先端技術が開発され、それが実用種に応用されるという図式がバイオテックでの基本原理では多く見られる。トランスジェニック技法は、単離され構造が解明された遺伝子の機能や発現調節を研究するのに利用するための基本的な手法として確立される必要がある。またそれと関連して、マウスで行われているキメラやノックアウト動物の利用のための基礎となる胚性幹(ES)細胞系の開発研究はメダカやゼブラフィッシュでも始まっており、細胞系の樹立の報告が出始めている。この分野は一旦手法ができれば様々な応用が開ける基本分野として今後に期待がかかっている。

#### 4. 今後の課題

最後に水産バイオテック研究の今後について少し考えてみたい。魚介類実用種の育種研究は、古典的手法による遺伝形質の研究が遅れたままバイオテック研究が先行した感がある。当初はバイオテック研究により、遺伝形質の研究が進むと思われたが、遺伝の基本である交配は継代といった手法が労力と時間がかかるため、重要視されなかった面がある。育種の基本は多様な遺伝資源から人類に役立つ変異を如何に効率よく固定するかであろう。バイオテックはその支援技術にすぎない。ある生物を持続的に

利用するには、その生物の持つ個体としての調和を保ちつつ利点を引き出す必要がある。染色体レベルであれ、遺伝子レベルであれ、操作された生物の飼育特性を十分把握することが肝要である。そのための体制の整備のための官、学、産を含めたチームやネットワーク作りが大切であろう。

いま一つは、種の特定である。サケ科魚類、マダイ、ヒラメあるいはマガキ、アコヤガイといった実用種のバイオテック研究は主に各地域の試験研究機関や大学で進んでいる。少ない勢力で水産動物のバイオテック研究を進めるにはこのような種を絞り込んだ進め方も必要だろう。特に近年盛んになり、魚介類でも重要になるであろうゲノム計画ではそのような考え方が特に重要となろう。水産の場合、規模が小さい業種が多く、養殖業の将来をみこした予測が魚種を選ぶ場合大切であろう。

遺伝子のクローニング、その発現調節機構、遺伝子の修飾などプロモーター、エンハンサー等の解析が大切なことは共通認識としてであろう。10年前には、クローニングされた魚類の遺伝子は非常に限られていた。現在までにクローニングされた水産動物(水棲動物でなく)の遺伝子がいくつであろうか。日進月歩の世界であるので把握は難しいが、他の実用動物と比較してそう多くないことは確かであろう。前述したように、ゼブラフィッシュやメダカあるいはウニが発生生物学の遺伝学の素材として注目されて、多くの遺伝子がクローニングされている。これらの成果・蓄積・経験あるいは公表されていないかもしれないが失敗や苦い体験を、水産動物の育種に如何に生かすかが今後の重要な課題であろう。

国内情報

## アグロバクテリウム利用のコ・トランスフォーメーションによる選抜マーカールを含まない形質転換植物の作出

日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所

小鞠 敏彦

2つの T-DNA を有するスーパーバイナリーベクターを開発し、第1の T-DNA に薬剤耐性の選抜マーカール遺伝子、第2の T-DNA に GUS 遺伝子を配置した。このベクターを含むアグロバクテリウムによって、イネとタバコの形質転換体を多数作成したところ、約半数に2種の T-DNA が含まれており、さらに、その半数以上から、GUS は含むが選抜マーカールは含まない子孫植物が得られた。第2の T-DNA には、容易にさまざまな遺伝子を導入することができる。

### 1. はじめに

アグロバクテリウム（根頭がん腫病菌、*Agrobacterium tumefaciens*）は、双子葉植物の傷口の細胞を形質転換し、クラウンゴールという腫瘍を起こす細菌である。この細菌を利用し、高等植物に効率良く外来遺伝子を導入する手法が開発されている。当初は、双子葉植物にしか利用できない方法であったが、最近では、イネ<sup>1)</sup>やトウモロコシ<sup>2)</sup>においても標準的な外来遺伝子導入法として活用されるようになってきている。この手法の利点は形質転換効率が高いことや、導入される DNA 断片が長く、コピー数が少ないことなどである。

形質転換実験の初期段階では、多数の細胞の中から極めて少数の形質転換細胞を選抜しなければならないため、薬剤耐性遺伝子などの選抜マーカール遺伝子が必要である。しかし、形質転換植物が得られた後は選抜マーカールは不要となり、形質転換植物にさらに外来遺伝子を導入する場合に、別の選抜マーカールが必要となるなどの問題も生じる。そこで、形質転換植物からマーカールを除去する手法が必要であり、トランスポゾンや部位特異的組換え酵素を利用する方法などさまざまな手法が検討されている。中でも有力なのが、選抜マーカールと目的遺伝子を連結しないで導入する

コ・トランスフォーメーション法である。選抜マーカールと目的遺伝子が接続されていないため、後代で両遺伝子が分離し、目的の遺伝子のみを含む形質転換体の獲得が期待できるのである。コ・トランスフォーメーション法は、エレクトロポレーション法などの直接導入法ではすでに一般的な方法である。しかし、アグロバクテリウム利用の形質転換法では、適当なベクターが開発されていなかった。

アグロバクテリウムによるコ・トランスフォーメーションの試みは10年ほど前から報告がある。1つの菌内に2つの T-DNA を配置する方法<sup>3)</sup>と、2種の菌を混合して用いる方法<sup>4)</sup>が検討され、前者については、1つのベクター上に2つの T-DNA を組み込む場合と、2つのベクターを用いる場合がある。いずれの方法でも成功例は報告されているが、コ・トランスフォーメーションの頻度や、後代で T-DNA が分離する頻度については、実用的なレベルではなかった。

我々は、A 281 という強病原性のアグロバクテリウムの遺伝子を用いて、形質転換効率の極めて高いスーパーバイナリーベクターを開発し<sup>5,6)</sup>、種々の植物の外来遺伝子導入実験に利用している。この高い効率が、コ・トランスフォーメーション法の改良に有用であると考え、コ・トランスフォーメーションに適したベクターの開発を行った。ここでは、2つの T-DNA を配置したスーパーバイナ

KOMARI Toshihiko

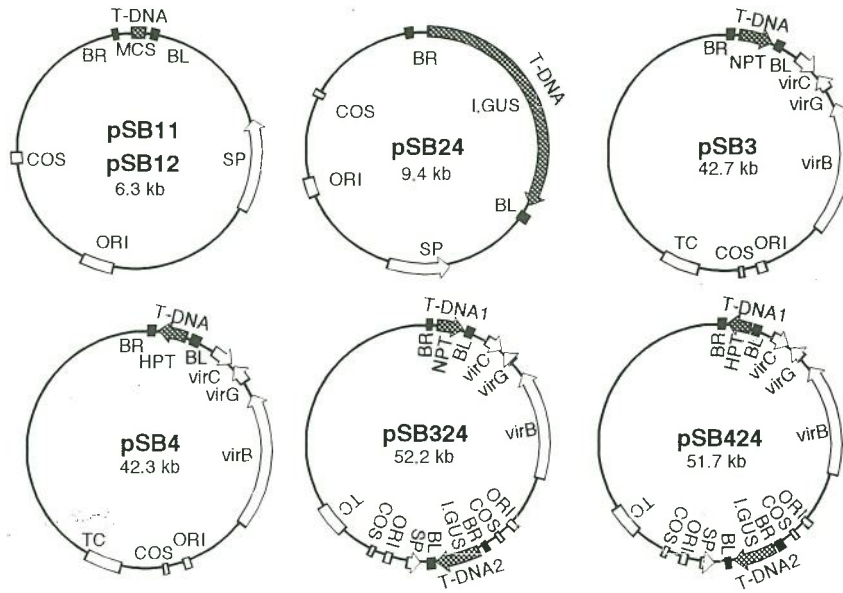


図1 主なプラスミド

BR: 右ボーダー, BL: 左ボーダー, MCS: マルチクローニングサイト, HPT: ハイグロマイシン耐性遺伝子, NPT: カナマイシン耐性遺伝子, I.GUS: イントロンを含む GUS 遺伝子, SP: スペクチノマイシン耐性遺伝子, TC: テトラサイクリン耐性遺伝子, ORI: CoIE1 複製機能, COS: スファージ cos 部位, virB, virC, virG: A281の *vir* 遺伝子

リーベクターについて紹介する。

## 2. ベクター系の構築

pSB 424 (図1) は、2つの T-DNA を配置したスーパーバイナリーベクターの1例である。第1の T-DNA には、選抜マーカーのハイグロマイシン耐性遺伝子が含まれており、第2の T-DNA には、GUS 遺伝子が配置されている。2つの T-DNA は15.2kb および21kb の DNA 断片によって隔てられており、前者には菌系 A 281のヴィルレンス遺伝子の1部、後者には広宿主域の複製機能が含まれている。このベクター構築の最終段階は、pSB 4というアクセプターベクターと、pSB 24という中間ベクターの間のアグロバクテリウム細胞中での相同組換え(図2)である。pSB 24は pBR 322 に由来する小型のベクターであり、アグロバクテリウム中では増殖できないが、pSB 4は大腸菌とアグロバクテリウムの双方で増殖するプラスミドである。pSB 4と pSB 24には2.7kb の共通領域があり、相同組換えにより pSB 24を pSB 4に組み込むことができる。pSB 24は組み込まれた形でないとアグロバクテリウムには保持されない。あらかじめ pSB 4を導入して

おいたアグロバクテリウムに pSB 24を導入し、pSB 24特異的な抗生物質耐性(スペクチノマイシン耐性)の菌を選べば、容易に相同組換え産物である pSB 424を含む菌が得られるのである。pSB 24には、大腸菌を用いた通常のクローニング作業により他の遺伝子を導入することが可能である。また、T-DNA

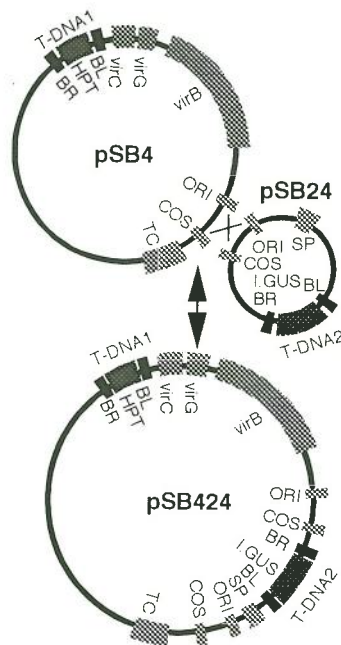


図2 相同組換え模式図

中にマルチプルクローニング部位のみを配置した中間ベクター pSB 11 と pSB 12 (図 1) を利用すれば、さまざまな遺伝子を第 2 の T-DNA に導入することができる。

一方ほぼ同様の手順で第 1 の T-DNA にカナマイシン耐性遺伝子を配置した pSB 324 (図 1) を作成した。

### 3. 形質転換

これらのベクターを含むアグロバクテリウムを用いて、イネおよびタバコの形質転換実験を行った。同時に選抜マーカーと GUS を接続した通常のベクターによる形質転換や、選抜マーカーと GUS を別々の菌中に配置し混合して用いる方法も実施した。イネ・タバコの形質転換法は既報<sup>17)</sup>に従った。多数の薬剤耐性の形質転換植物を再生させ、葉片を切り取り GUS 発現を調査したところ、pSB 324 と pSB 424 により形質転換された薬剤耐性植物の 47~52% に GUS 活性が検出された (表 1)。通常の GUS と選抜マーカーを連結したベクターの場合でも、薬剤耐性植物の 85% に GUS 活性が検出されるのみであり、pSB 324 と pSB 424 によるコ・トランスフォーメーションの頻度はかなり高いといえる。

混合法の場合は、GUS 発現個体の割合は 35% 以下であり、GUS 発現個体が得られない場合もあるなど、コ・トランスフォーメーションの頻度は低かった。ただし、GUS を

含む菌の相対濃度を高めたり、GUS 導入にスーパーバイナリーベクターを利用することにより、コ・トランスフォーメーションの頻度を向上させることができると考えられる。

一部の形質転換植物については、サザンハイブリダイゼーションまたは Polymerase Chain Reactions (PCR) によって、導入遺伝子の確認を行った。その結果、GUS 活性を示す薬剤耐性個体からはすべて両遺伝子が検出された。

### 4. 遺伝分析

薬剤耐性の GUS 発現個体を温室で栽培し、採種後、次世代の植物各 50~70 個体について両形質の発現を調査したところ、GUS 発現、薬剤耐性ともメンデルの法則に従って遺伝しており、両形質が独立の場合と連鎖している場合があった。例えば LBA 4404 (pSB 424) によって形質転換した GUS 陽性の薬剤耐性イネ 20 個体の次代植物の分析では、うち 13 個体において、少なくとも 1 因子の GUS 遺伝子が薬剤耐性遺伝子とは独立に遺伝しており、GUS のみを含む形質転換植物が得られた (表 2)。これらの結果は、タバコについてもイネについても、pSB 324 や pSB 424 によって形質転換した場合、2 つの T-DNA を含む植物体の半数以上から、選抜マーカーを含まない形質転換体 that 得られたことを示している。

表 1 形質転換体の GUS 活性

形質転換に用いた菌系	菌系・ベクターの特性	供試した形質転換体	GUS 活性を示す個体数	%
タバコ				
LBA4404(pGA482-GUS)	GUS と NPT を連結したベクター	39	33	85
LBA4404(pSB324)*	コ・トランスフォーメーション用ベクター	118	61	52
LBA4404(pSB424)*	コ・トランスフォーメーション用ベクター	109	54	50
LBA4404(pSB124)* と LBA4404(pGA482) の混合	GUS を含む菌と NPT を含む菌の混合	100	35	35
LBA4404(pNB124) と LBA4404(pGA482) の混合	GUS を含む菌と NPT を含む菌の混合	100	22	22
LBA4404(pTOK253) と LBA4404(pGA482) の混合	GUS を含む菌と NPT を含む菌の混合	110	0	0
LBA4404(pGA482)	NPT を含むベクター	25	0	0
イネ				
LBA4404(pTOK233)*	GUS と HPT を連結したベクター	234	199	85
LBA4404(pSB424)*	コ・トランスフォーメーション用ベクター	549	259	47
LBA4404(pSB124)* と LBA4404(pSB4)* の 3:1 混合	GUS を含む菌と HPT を含む菌の混合	49	7	14
LBA4404(pSB124)* と LBA4404(pSB4)* の 1:1 混合	GUS を含む菌と HPT を含む菌の混合	82	2	2

\* : スーパーバイナリーベクター, NPT : カナマイシン耐性遺伝子, HPT : ハイグロマイシン耐性遺伝子

表2 遺伝分析の結果

植 物	形質転換に用いた菌系	供試した R1 系統数	GUS を発現する 薬剤感受性個体が 得られた系統数	%
タバコ	LBA4404(pSB324)	9	5	56
	LBA4404(pSB424)	10	10	100
	LBA4404(pSB124) と LBA4404(pGA482) の混合	14	10	71
イネ	LBA4404(pSB424)	20	13	65
	LBA4404(pSB124) と LBA4404(pSB4) の混合	2	2	100

一部の子孫植物については、サザンハイブリダイゼーションまたは PCR によって、導入遺伝子の確認を行った。その結果、表現型と遺伝子型は完全に一致していた (図3)。

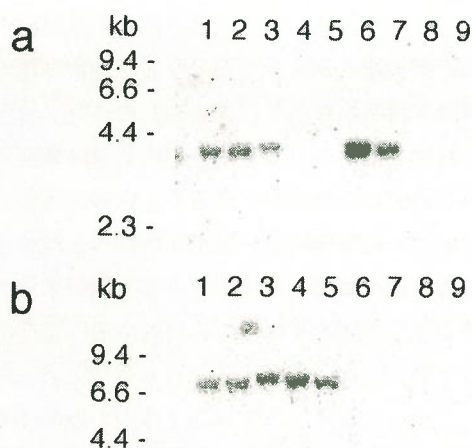


図3 イネ形質転換体 R424-1 の分析  
R0 植物 (レーン1), ハイグロマイシン耐性・GUS 陽性の R1 植物 (レーン2と3), ハイグロマイシン感受性・GUS 陽性の R1 植物 (レーン4と5), ハイグロマイシン耐性・GUS 陰性の R1 植物 (レーン6と7), ハイグロマイシン感受性・GUS 陰性の R1 植物 (レーン8と9) のそれぞれから単離した DNA を *Hind*III で分解しサザンハイブリダイゼーションを行った。aではハイグロマイシン耐性遺伝子, bではGUS遺伝子をプローブとした。

### 5. おわりに

本研究で開発したベクターにより、アグロバクテリウムを介する植物の形質転換においても、容易にコ・トランスフォーメーションを行うことができることが明らかになった。このベクターには、簡便な手順でさまざまな有

用遺伝子を組み込むことができるうえに、形質転換効率、コ・トランスフォーメーション頻度、選抜マーカーと連鎖しない導入断片の頻度、いずれについても高いという特徴がある。このベクターを利用すれば、形質転換植物の半数以上で有用遺伝子の発現が期待でき、さらに、その半数以上の植物の種子から、有用遺伝子は含むが選抜マーカーは含まない形質転換体を得られると期待できるのである。このベクターは、広範な植物を遺伝子工学により改良する研究において幅広く活用できると考えられる。

### 文 献

- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro (1994) *Plant J.*, 6: 271-282
- Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari and T. Kumashiro (1996) *Nature Biotechnol.*, 14: 745-750
- De Framond, A. J., E. W. Back, W. S. Chilton, L. Kayes and M.-D. Chilton (1986) *Mol. Gen. Genet.*, 202: 125-131
- De Block, M. and D. Debrouwer (1991) *Theor. Appl. Genet.*, 82: 257-263
- Komari, T. (1990) *Plant Cell Reports*, 9: 303-306
- Saito, Y., T. Komari, C. Masuta, Y. Hayashi, T. Kumashiro and Y. Takanami (1992) *Theor. Appl. Genet.*, 83: 679-683
- Komari, T., Y. Saito, F. Nakakido and T. Kumashiro (1989) *Theor. Appl. Genet.*, 77: 547-552

国内情報

## キメラ化による酵素の耐熱性向上

農林水産省 食品総合研究所 応用微生物部

林 清

自然界には、40億年にわたる生物の進化の過程で作り出された様々な酵素が存在するが、優れた酵素を見いだすことは至難の技である。ところが、近年、生物が長い年月をかけて行ってきた進化の過程を試験管内で人為的に実施することが可能となり、進化分子工学が提唱されている。酵素遺伝子の一部を交換するシャッフリングはその一例である。セルラーゼの一種である $\beta$ -グルコシダーゼを対象とし、この手法を活用しキメラ酵素を調製したところ、耐熱性が6~16°C向上し、基質特異性が変化している酵素をつくり出すことができた。

### 1. はじめに

産業界では、多種多様な酵素が活用されている。身近な例をあげれば、洗濯用の洗剤に添加されているセルラーゼやタンパク分解酵素、澱粉を砂糖のような甘味料（果糖ブドウ糖液糖など）に変換するアミラーゼやイソメラゼ、さらには、ジーンズのストーンウォッシュ（ジーンズの色をまだらにする）の代わりとして利用されはじめたセルラーゼなど、様々である。こうした酵素の利活用の裏には、新しい酵素を求めて、たゆまぬスクリーニングが行われてきたし、現在も継続して行われている。自然界には様々な酵素が存在するが、目的にかなった優れた酵素を見いだすこと（スクリーニング）は至難の技であるし、既存の酵素の特性を改良すること（例えば耐熱性を5°C上げること）は不可能に近い。しかし、バイオテクノロジーを活用すれば、酵素の特性を改良したり、新しい酵素を設計することが可能となりつつある。

### 2. 生物の進化と酵素の進化

酵素は、生物の生命維持に必須であることから生物の進化とともに進化してきた。すなわち、酵素をコードする遺伝子上の突然変異により酵素を構成する1つのアミノ酸残基が

変化したり、遺伝子の相同組換えにより酵素の一部の領域が入れ替わるなどの過程を経て、様々な酵素が誕生し、淘汰されてきた。とりわけ酵素活性の制御は、生命の維持に重要であることから、酵素の進化の方向は、生産物阻害などの酵素反応の緻密な制御へと向けられた。代謝調節に関与している各種のアロステリック酵素などは、この目的に沿って進化した酵素の良い例である。

しかしながら、こうした生体内での活性の制御機構の高度化といった進化の方向は、我々が酵素を活用する際にはさほど重要ではない。例えば、我々が酵素を利活用する際に求める重要な因子の一つとして熱安定性があげられるが、酵素の熱安定性は生物にとってはさほど重要な因子ではなかった。大半の生物は常温で生育していることから、酵素が常温で安定でさえあれば十分であり、酵素の熱安定性の向上という進化の方向は選択されなかったのである。むしろ、耐熱性が高い酵素では、生体のような常温における酵素1分子当たりの活性は低下する傾向にさえある。

### 3. 人為的な酵素遺伝子の改良（進化分子工学）

ところが、近年、生物が長い年月をかけて行ってきた進化を試験管内で人為的に実施することが可能となった。例えば、薬剤（抗生物質）が存在しない条件下では高温で生育可

HAYASHI Kiyoshi



能な微生物に、耐熱性が常温の薬剤耐性遺伝子を入れ、この微生物を薬剤存在下で高温で培養するのである。薬剤耐性遺伝子の産物である酵素は生産されるが、培養条件が高温であるためこの酵素は失活し薬剤を無毒化できないため、微生物は生育できない。しかし、酵素の耐熱性が向上するような変異が薬剤耐性遺伝子に生じた場合には、この微生物は生育できるのである。薬剤存在下の高温条件下で生育してきた微生物から薬剤耐性の遺伝子を取り出し分析することにより、薬剤耐性酵素の耐熱性向上機構が解明できる。ただし、こうした変異は、通常、一か所のアミノ酸が他のアミノ酸と置き換わった場合が多く、酵素の構造を大幅に変えることは出来ない。そのため、このような実験系で得られた変異体の数はきわめて限られ、酵素の耐熱性向上機構の解明には十分ではない。

酵素を構成するアミノ酸残基を大幅に変更するためには、遺伝子の相同組換えを利用する系を開発する必要がある。酵素遺伝子の一部を交換するシャッフリングは、この相同組換えに相当する。生物種の全く異なる遺伝子を対象に、シャッフリングできることから、自然の営みを超越した手法でもある。この手法を活用すれば、既存の酵素の分子構造を改変でき、その中には、耐熱性が向上したり、基質特異性が変化した酵素が得られるのである。その際、タンパク質のドメインやモジュールの概念を導入することにより、より高い効率で遺伝子をシャッフリングしキメラ酵素を作成することが出来る。また、酵素は直鎖状につながったアミノ酸が幾重にも折り畳まれた複雑な構造をしているが、人工的に設計した遺伝子を発現した際には、活性のある形に折り畳まれないことも多い。こうした際には、分子シャペロンを活用することにより、活性型に折り畳むことも可能である。

#### 4. キメラ酵素の作出

当研究室では、セルロースを分解するセルラーゼの一種である  $\beta$ -グルコシダーゼを対象とし、キメラ酵素を調製したところ、耐熱

性が向上し、基質特異性が変化している酵素を得ることに成功した。

まず、当研究室の  $\beta$ -グルコシダーゼ<sup>1)</sup> (細菌 *Cellvibrio gilvus* が生産し、以下 CG と略す) とアミノ酸配列が比較的類似している酵素をデータベースを用いて検索した。これまで報告されている50,000を超えるタンパク質から、10あまりの酵素が選択された (表1)。そのうちの、細菌 *Agrobacterium tumefaciens* が生産する  $\beta$ -グルコシダーゼ (以下 AT と略す) とは、図1に示すような2か所のドメイン (領域) で高い相同性が認められた。また、*Ruminococcus albus* や *Butyrivibrio fibrisovens* 由来の  $\beta$ -グルコシダーゼにおいては、2つのドメインが逆転し

表1 *C. gilvus* 由来の  $\beta$ -グルコースコシダーゼと相同性の高い酵素

微生物	相同性スコア値
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (細菌)	1013
<i>Clostridium thermocellum</i> (細菌)	839
<i>Kluyveromyces fragilis</i> (酵母)	784
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> B (酵母)	710
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> A (酵母)	706
<i>Butyrivibrio fibrisovens</i> (細菌)	610
<i>Hansenula anomala</i> (酵母)	596
<i>Ruminococcus albus</i> (細菌)	582
<i>Schizophyllum commune</i> (糸状菌)	208
<i>Aspergillus wentii</i> (糸状菌)	101

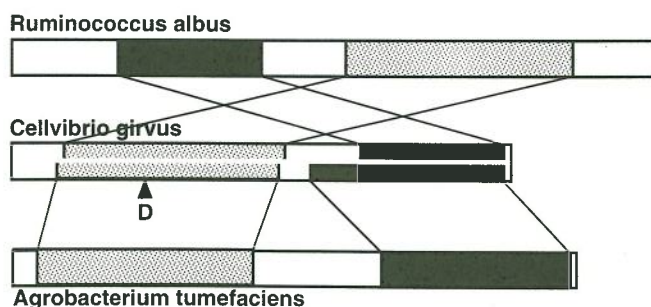


図1 生産菌の異なる  $\beta$ -グルコシダーゼのアミノ酸配列の相同性が高い領域  
活性中心のアスパラギン酸残基 (図中のDの記号) はCGの左側の領域に存在する。また、*Ruminococcus albus* や *Butyrivibrio fibrisovens* 由来の  $\beta$ -グルコシダーゼにおいては、2つのドメインが逆転している。

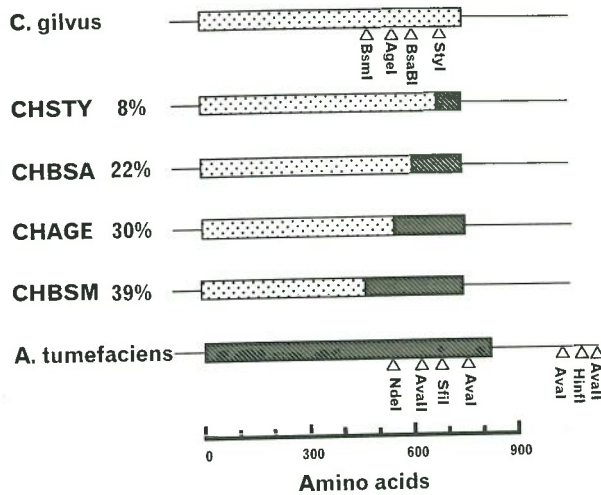


図2 4種のキメラ酵素の作成  
 図中の各種記号は、制限酵素名とその切断部位を示す。白い部分は *C. gilvus* 由来、斜線部分は *A. tumefaciens* 由来であることを示す。

ていた。進化の過程で、重要なドメインは保存される傾向が高いことから、この酵素は、大きく2つのドメインから構成されていることが推察された。

CGの左端のドメイン(N末端ドメイン)には活性中心であるアスパラギン酸残基が存在していることから、図2に示したようにCGの右端(C末端ドメイン)をATの右端(C末端ドメイン)と入れ替えた4種類(39%をシャッフリングしたCHBSM、30%をシャッフリングしたCHAGE、22%をシャッフリングしたCHBSA、8%をシャッフリン

グしたCHSTY)のキメラ酵素を作出した<sup>2,3)</sup>。

このキメラ酵素の遺伝子を大腸菌で発現させ、4種類のキメラ酵素と、両親であるCG、ATの酵素の耐熱性を比較した。CGを基に作り出したキメラ酵素の耐熱性は、CGよりも向上していた。50%の残存活性が認められた加熱処理温度は、CGが41°Cであり、ATは67°Cであるのに対し、4種のキメラ酵素が47~57°Cであることから、キメラ酵素の耐熱性は6~16°C向上した。また、キメラにした領域が大きいほど耐熱性は向上していた(図3)。このことは、耐熱性向上に関与するドメインが存在するのではなく、分子全体に広がっていることを示唆している。

さらに、酵素の基質認識にも大きな影響をあたえていることが判明した(表1)。グルコースの誘導体(p-ニトロフェニル-β-D-グルコシド)では、キメラ酵素のKm値(酵素が基質分子を認識する強さを示す値で、値が小さいほど強く認識することを示す)は、CGとATの中間的な値であった。しかし、キシロース(グルコースとは6位の構造が異なる)誘導体では、キメラ酵素のKm値は、ATのものに非常に近く、しかもVmax値(酵素反応の最大速度であり、値が大きいほど酵素の基質分解速度が速い。この表では、

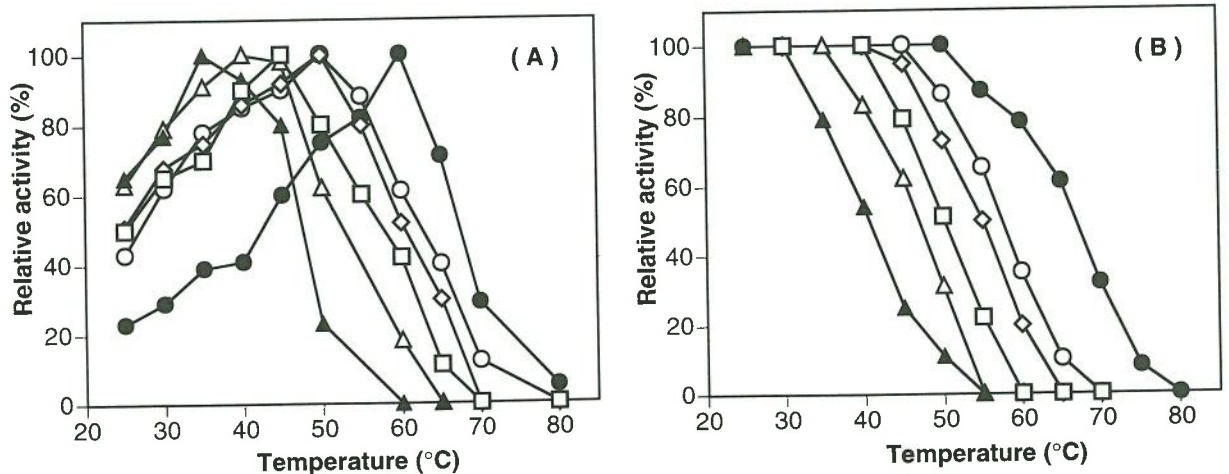


図3 キメラ酵素の至適温度(A)と熱安定性(B)  
 ▲: *C. gilvus*, △: CHSTY, □: CHBSA, ○: CHBSM, ●: *A. tumefaciens* 由来のβ-グルコシターゼをMOPS緩衝液pH6.5中、各温度での酵素活性(A)と、同緩衝液において1時間保持後の残存酵素活性(B)

表2 キメラ酵素とその両親の酵素の酵素化学的特性の比較

基質	AT	CHBSM	CHAGE	CHBSA	CG
p-ニトロフェニル-β-D-グルコシド					
Km (mM)	0.032	0.270	0.291	0.273	1.806
Vmax (%)	100	100	100	100	100
p-ニトロフェニル-β-D-キシロシド					
Km (mM)	0.005	0.004	0.004	0.005	6.261
Vmax (%)	14	9.1	7.2	7.7	0.81
p-ニトロフェニル-β-D-ガラクトシド					
Km (mM)	13.1	16.6	15.1	34.4	10.8
Vmax (%)	63	43	32	49	0.15
p-ニトロフェニル-β-D-フコシド					
Km (mM)	0.123	0.210	0.166	0.277	—
Vmax (%)	20	14	10	11	<0.001

グルコース誘導体を100としたときの相対値で表示しており、グルコース誘導体と比べどの程度の速さで基質を分解するかがわかる。)も、ATに近いものであった。ガラクトース(グルコースとは4位の水酸基の位置が異なる)誘導体において、Km値に関しては、CGとATとで、さほど大きな差が認められないことから、キメラ酵素もほぼ同様な値を示した。しかし、Vmax値では、キメラ酵素はATに近い値を示した。また、フコース誘導体では、CGは全く分解することが出来ないためKm値が測定できないが、3種のキメラ酵素は、ATに近い値を示した。キメラ酵素は、CGの領域が大半(78~61%)であり、ATの領域は少ない(22~39%)にもかかわらず、基質認識に関してはCGよりもむしろATに近い性質を示した。このことは、キメラにしたCGの右端(C末端ドメイン)は、基質認識に大きく関与していることを示唆している。

## 5. まとめ

こうしたキメラ酵素創製に関する研究は着

手され始めたばかりであり、研究報告も限られているが<sup>4-9)</sup>、キメラにする酵素遺伝子の検索はデータベースを使用すれば容易であり、キメラ化する部位の組み合わせは無限である。今後、ますます優れた特性を有する様々なキメラ酵素が作り出されることが大いに期待される。

本研究は、農林水産省農林技術会議事務局の大型別枠研究「生物情報」の一部として行われた。

## 参考文献

- 1) Kashiwagi, Y., C. Aoyagi, T. Sasaki and H. Taniguchi (1993) *J. Ferment. Bioeng.*, 75: 159-165
- 2) Singh, A., K. Hayashi, T. T. Hoa, Y. Kashiwagi and K. Tokuyasu (1995) *Biochem. J.*, 305: 715-719
- 3) Singh, A. and K. Hayashi (1995) *J. Biol. Chem.*, 270: 21928-21933
- 4) Numata, K., M. Muro, N. Akutu, Y. Nosoh, A. Yamagishi and T. Oshima (1995) *Protein Eng.*, 8: 39-43
- 5) Molgat, G. F., L. T. Donald and H. W. Duckworth (1992) *Arch. Biochem. Bio-*

- phys.*, 298 : 238-246
- 6) Kataoka, K., H. Takada, K. Tanizawa, T. Yoshimura, N. Esaki, T. Ohshima and K. Soda (1994) *J. Biochem (Tokyo)*, 116 : 931-936
- 7) Tsai, H. T. and J. E. Wilson (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, 316 : 206-214
- 8) Sode, K., H. Yoshida, K. Matsumura, T. Kikuchi, M. Watanabe, N. Yasutake, S. Ito and H. Sano (1995) *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 211 : 268-273
- 9) Newsted, W. J., M. Ramjeesingh, M. Zywuiko, S. J. Rothstein and E. Y. Shami (1995) *Enz. Microbial Technol.*, 17 : 757-764

#### 用語解説

**キメラ**：キメラとはギリシャ神話に登場する、ライオンの頭、ヤギの体、ヘビの尾を持ち、口から火をふく仮想上の動物の意味から派生した。生物個体だけでなく物質についても用いられる表現で、キメラタンパク、キメラ抗体、キメラDNAなどと呼ばれる。

**ドメイン**：タンパクでの構造上、または機能上の小区域または単位。通常、アミノ酸残基50~200個からなるポリペプチド鎖が折りたたまれてドメインを形成しており、フォールディングの単位であり、機能の単位でも考えられている。

**フォールディング (折りたたみ)**：細胞内または水溶液中で、タンパクが自律的に立体構造を形成する過程。

**シャペロン**：タンパクが活性を発揮できる立体構造の形成・保護やタンパクの運搬を助けるタンパクであり、以下の機能を有する。①うまく折りたたみができないタンパクの折りたたみを助ける。②合成直後のタンパクに結合して折りたたみを停止させ、膜に存在するタンパク輸送装置で運ばれやすい状態を保つのに役立つ。③細胞が高温などのストレスにさらされたとき、細胞中のタンパクが不可逆的に変性しかかるのを保護する。

(日経バイオ最近用語事典等より)

## ショウロの増産技術

島根県林業技術センター

平佐隆文・富川康之

菌根性きのこであるショウロの増産試験を行った。クロマツ樹冠下へ子実体破砕片懸濁液を散布して、子実体が発生することを確認した。2年生クロマツ苗床で多数のショウロが発生したことに注目した。この苗木を移植しても子実体発生が継続した。クロマツ林床に木炭を埋めたところ、その2～3年後にはショウロの発生が著しく増加し、またクロマツの生長が良好になった。培養したショウロ菌そうをクロマツ苗に接種した結果、人工的に菌根を合成することができた。

### 1. はじめに

ショウロ (*Rhizopogon rubescens*) は海岸砂丘地のクロマツ林で春と秋に発生する球形、直径1～3 cm、白～淡黄色のきのこである。味が良く、噛むとシャリシャリとしたリングのような歯ごたえが特徴である。近年、燃料用として松葉かきが行われなくなって腐植層が溜まり、また松くい虫による枯死木が増加してショウロの発生量は激減しており、増産技術の開発が期待されている。

ショウロはマツタケなどと同様に生きた樹木の根に菌根と呼ばれる組織を形成して共生するきのこの仲間である。これら菌根性きのこを人工的に生産する試みとしては、林地へ胞子を散布したり培養菌体を埋める方法、実験室内で寄主植物の根に培養菌を接種して菌根を形成させて、この苗を野外に定植する方法などがある。なお、ホンシメジでは施設内で、培地上にきのこを発生させる方法が最近開発された<sup>1)</sup>。

当センターでは1986年から子実体(きのこ)破砕片懸濁液の散布、自然感染苗の移植、林地への木炭埋め込みなど、ショウロを増産するための試験を行った<sup>2,3)</sup>。また、実験室内で人工的に菌根合成苗を生産する試験を行った<sup>4)</sup>。なお、この試験の一部は林野庁の研究費助成を受けて、森林総合研究所と他府県の

研究機関が共同で行った試験である。

### 2. クロマツ幼齢木へのショウロ接種

花崗岩風化土壌を客土した区画に、7～9年生のクロマツ4本を移植した。3月に海岸砂丘林で採取したショウロ子実体30個を乳鉢ですりつぶし、殺菌水2 lを加えて子実体の破砕片懸濁液を調整した。マツ樹冠下の表層土壌を削り取って、懸濁液をかん注した。子実体は3年間継続して発生し、とくに散布年の秋と次年の春に多量発生した(表1)。子実体は懸濁液を接種した附近から発生したので、接種による子実体の発生と考える。

表1 子実体破砕片懸濁液散布後のショウロ子実体の発生経過

発生時期	子実体数	発生重量(g)
散布年の秋	7	14.0
次年の春	19	24.8
秋	0	0.0
次々年の春	3	7.6
秋	2	3.6

### 3. 苗畑でのショウロの自然発生と感染苗移植による発生

当センター内のクロマツ苗床、1回床替え2年生苗でショウロが発生した。2月下旬～4月下旬、1 m<sup>2</sup>当たり15個、40 gの子実体が発生した。これは海岸砂丘地での発生量、1 m<sup>2</sup>当たり約3個、5 gと比べて多量である。ショウロがこのように若齢の苗木にも多



図1 菌根を形成したクロマツ細根  
(スケールは1mm)

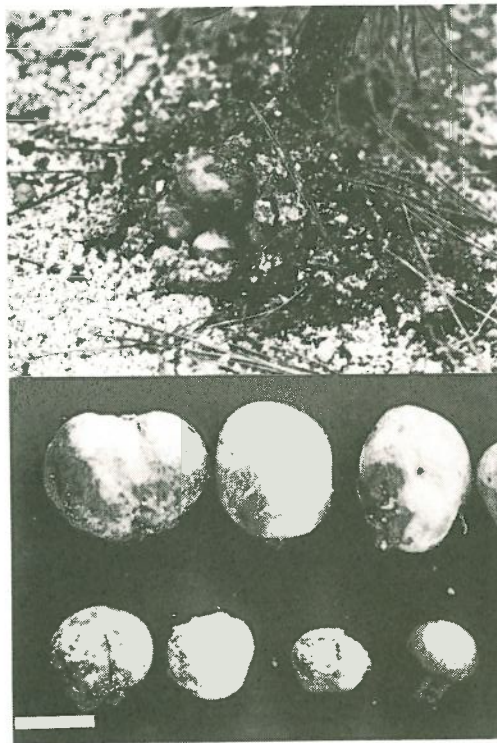


図2 ショウロ子実体  
上：移植した自然感染苗の根元から発生  
下：採取した子実体 (スケールは1cm)

表2 木炭埋め込みによるショウロ発生量

調査年	木炭区		対照区	
	子実体数	発生重量(g)	子実体数	発生重量(g)
埋め込み年	22	56	24	58
2年目	44	103	16	36
3年目	88	255	23	65
4年目	35	93	20	42
5年目	20	51	11	20
6年目	3	6	2	3

数発生することに注目した。

6月に苗木を掘り取り、細根の先端が分岐して、白色の菌糸束が絡み付いたショウロの菌根が生じている苗木を選んで、海砂を客土したコンクリートフレームに移植した(図1)。フレーム内での子実体の発生は5年間継続して、接種当年の秋に1m<sup>2</sup>当たり16個と最も多数発生した(図2)。菌根を形成した苗木を移植しても菌根が存在し続け、子実体が多数発生することを確認した。

#### 4. 木炭埋め込みによるショウロの増産

千葉県海岸クロマツ林において土壌改良材として粉炭を埋め込んだ結果、クロマツの生長が良好になると同時に、ショウロが多数発生した<sup>5)</sup>。この事実を再確認するため、木炭埋め込みによるショウロの増産効果を検討した。島根県江津市の海岸砂丘地、樹齢10~20年生のクロマツ林に10×10mの試験区を設けた。使用した木炭はチップ屑と樹皮による粉炭で、2月に林内に溝を掘って埋めた。ショウロ発生は粉炭を埋めた年には対照区との差はなかったが、2年目には約3倍、3年目には約4倍発生した。しかし、4年目以降は発生量が減少すると同時に対照区との差は小さくなった(表2)。木炭によるショウロ増産効果は認められたが、1回の使用では効果が持続しなかったため、施用方法について検討する必要がある。

木炭を埋めてから14か月後にクロマツの根の重量を調査した。木炭を含む層では、直径2mm以下の細根量は対照区に比べて約2倍生長していた。また、木炭区でのクロマツの地上部の伸長生長量は、2年目に1.3倍、3年目には1.7倍となった。

#### 5. ショウロ菌根合成苗の生産

菌根合成苗を実験室内で、人工的に生産する方法を試みた。まず、太田が考案した菌根菌用培地<sup>6)</sup>によって、ショウロ菌の液体深部培養を行って菌そうを得た(図3)。つぎに、日向土に上述の培養液を含浸した後、菌そうを接種した。約3か月で日向土に絡み付く菌

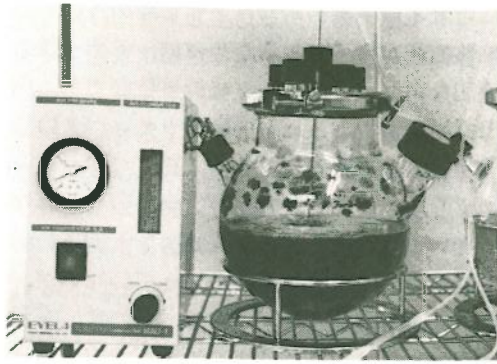


図3 ショウロ菌の液体深部培養

糸が培養瓶全体に拡がった。

一方、無菌的に発芽させたクロマツ苗を12か月育成して、菌根合成試験用の無菌苗を作成した。日向土培養菌そうを入れたガラス瓶に無菌苗を移植して、クリーンルーム内で育成した。3か月後、約半数の苗で細根に絡む菌糸束が見られ、また生物顕微鏡による観察では細根の表皮を取り巻く菌鞘、表皮細胞間隙に菌糸が網目状に入るハルティッヒネットを認めたので、菌根が合成されたと判定した。

なお、試験期間中に多くの苗が枯死したが、これは照度や水分の不足が考えられる。育苗法の改良が望まれる。また、菌根合成を確実にを行う方法を検討し、菌根合成苗を野外へ定植して子実体発生を確認することが必要と考える。

## 6. おわりに

海岸砂丘地だけでなく、クロマツ苗畑でのショウロ生産は可能と考えられる。子実体破砕片懸濁液の散布や、自然感染苗木を移植するなど実用的な生産技術を確認する必要がある。海岸砂丘のクロマツ林では、木炭埋め込みによるショウロ増産が可能である。この方法はクロマツの生長を促進する上でも意義があると考えられる。また、人工的に菌根合成した苗木の移植によるショウロ生産についても検討する必要がある。

## 文 献

- 1) Ohta, A. (1994) *Mycoscience*, 35: 147-151
- 2) 平佐隆文 (1991) 島根林技研報, 42: 37-44
- 3) 平佐隆文 (1992) 島根林技研報, 43: 25-30
- 4) 平佐隆文 (1995) 島根林技研報, 46: 53-56
- 5) 小川眞 (1987) 作物と土をつなぐ共生微生物, 農文協, p.144-147
- 6) Ohta, A. (1990) *Trans. mycol. Soc. Japan*, 3: 323-334

## 文献情報

培養細胞の核移植による  
クローンの成功

哺乳動物の発生における遺伝的制御の解析が試みられている。クローニングは同じ遺伝的制御におかれた個体作出ができることから、解析法として有用であるのみならず、遺伝子操作個体の産生が可能であり、研究面および産業面で注目されている。しかしながら、産子が得られているのはドナー核として初期胚の割球、または胚由来の初代培養細胞をもちいた場合のみであった。Campbellらは、ヒツジ胚から全ての細胞型に分化できる全能性を保持した細胞株を樹立し、その培養細胞の核移植を行ない哺乳類の産子を得ることに初めて成功した。

Campbellらは、胚由来の細胞を6-13代継代培養し、核移植前に血清飢餓により静止状態にした細胞の核を、除核した卵母細胞に移植した。こうして再構築された胚は全能性を保持しており、桑実期や胚盤胞期まで発生できる。そして34個の桑実期、胚盤胞期の胚を子宮に移植し、5頭の正常産子を得た。5頭とも雌であった。核移植では、ドナー核がレシピエント卵子内で胚発生の再プログラミングを始動させ、正常な胚発生を進行させながら、最終的な個体発生を誘導させて初めて成功したといえる。彼らは、ドナー細胞の静止化を誘導することがドナーのクロマチン構造を再プログラミングしやすくさせ、発生を可能にさせるのだろう、と述べている。また、このクローニング実験の成功はヒツジをもちいたことも大きな要因である、と指摘されている。分割期の割球をドナーとし、除核レシピエント卵子に移植し、正常産子を得た最初の成功例はやはりヒツジであったからである。

この成功で重要なことは、全能性を保持した細胞株を樹立したことにある。培養細胞の核移植によるクローニングが可能になったことで、株細胞を遺伝子操作したクローン個体の作出が可能となったからである。さらにジーンターゲットングも可能になっていくだろう。このことはヒツジや他の家畜への応用面で大きく前進させたといえる。

しかしながら、問題点もいくつかある。この報告の全体的な成功率、すなわち操作卵数

に対する産子数の割合は2%と極めて低い。核移植胚が産子になるためには、ドナー核の適切な再プログラミング機能に依存する。卵母細胞に蓄えられた mRNA やタンパクの機能する時間は限られており、再プログラミングより短いため、胚発生が完全に行なわれないという。ドナー核とレシピエント卵子の適合性についてはまだよく分かっていないが、少なくとも二つの因子がある。一つは、レシピエントには、受精卵より排卵卵母細胞のほうがよいということである。ドナー核の再プログラミングに必要な細胞質因子が存在し、染色体の再構成、ゲノムの活性化に働いているのだろう。二つ目は、ドナー核の細胞周期にある。G1期やG0期のほうがS期やG2期より適しているといわれている。再プログラミングにはDNAの複製がなされる前のほうがよいのだろう。

Campbellらの成功は、樹立した細胞株がただ単に全能性を保持しているのではなく、初期発生における胚ゲノムの活性化を再現できる細胞であったことが大きな要因であると考えられる。また逆に、操作卵数に対する産子数の割合が低いのもこの点にあるといえる。家畜等の動物のクローニングが有効であるのは明白であるが、技術的、生物学的な問題はまだまだ山積みである。しかしながら、彼らの結果は、胚盤胞期胚の内細胞塊由来の培養細胞の核移植による子牛の生産、霊長類のES細胞株の樹立等、異なった動物種のクローン作出に有用な知見となるであろう。

(抄訳 松本浩道—東北大農)

(MATSUMOTO Hiromichi)

**Lambing by nuclear transfer**

Solter, D.

*Nature*, 380 : 24, March 7, 1996

**Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line**

Campbell, K. H. S., J. McWhir, W. A. Ritchie, and I. Wilmut

*Nature*, 380 : 64, March 7, 1996

## 文献情報

鉄を食べやすくする(?)  
原生動物

海洋において、植物プランクトンの増殖に



必要な条件がほぼ整っていても、鉄の不足により、生育や増殖が制限されることが少なくないことが近年明らかになってきている。鉄を海水へ補給して植物プランクトンを増殖させることにより、地球温暖化の一因とされる二酸化炭素の吸収量を増加させるなど環境改善への応用も検討されている (Martin, J. H. *et al. Nature*, 371:123, 1994)。

海水中には、植物プランクトンが取り込むことができないコロイド状になった鉄が多く存在している。鉄が、このような生物にとって利用しにくい形から利用しやすい形へどのように変換されるかについて、光化学反応などいくつかの機構が提示されているが、Moffettらは、コロイド状の鉄が、原生動物の細胞の食胞内で消化されることにより、溶解しにくい構造を持った鉄が生物が利用しやすい鉄に変換されることを報告している。そこでその内容を紹介したい。

Moffettらは、10nm以下の大きさの水酸化鉄(III)が凝集してできた、長さが150nm以下の粒子を調製し、この粒子を含む海水に、原生動物の一種である鞭毛虫 *Cafeteria* sp. を餌 (細菌 *Halomonas halodurans*) と共に添加した。*Cafeteria* 無添加の系では変化がほとんど認められなかったのに対して、添加の系では、孔径50nmのフィルターを通過しない大きさの水酸化鉄粒子が、45時間以内にほぼ100%通過する大きさのコロイドあるいは溶液状態となった。

また、キレート化剤を添加した同様の実験系では、添加後30時間で10%の鉄がキレート化した (これ以降は減少)。このことは、キレート化剤との反応性が高く、つまり生物が利用しやすい反応性の高い鉄が生成されたことを意味している。

さらに、キレート化剤の代わりに、実際に珪藻 *Thalassiosira weissflogii* を接種して100時間培養してみると、*Cafeteria* 添加の系では、無添加の系と比較して、細胞数で8倍の増殖が見られ、珪藻細胞あたりのクロロフィルa量は2倍であった。

*Cafeteria* の培養濾液のみでは鉄に対する影響は認められなかったのに対して、Moffettらは、鉄が、原生動物の食胞内で、低pHで強い酵素活性の存在する環境にさらされることにより、生物が利用しやすい形に変換されるとしている。

本報は、原生動物、植物プランクトンとも一種ずつのみの検討であるので、原生動物による鉄の消化が、外洋において植物プランクトンの増殖や二酸化炭素の吸収をどの程度促進するのか明らかではないが、少なからず生態系や環境に影響を及ぼすことは明らかであり、さらに広範囲にわたる研究が望まれる。植物プランクトンの中には、共存する微生物から単離すると増殖が強く制限される場合も多く、ミクロの世界においてもこうした広い意味での共生関係を調べることは、生態、環境あるいは微生物利用における重要な研究課題と言える。

また、沿海において、キレート鉄の大量供給が赤潮の一因とされることから、赤潮発生の機構解明という視点から、種々の赤潮藻類の増殖と原生動物の関係を調べる研究も期待されることである。

(抄訳 土田貴正—マルハ(株)中研)

(TSUCHIDA Takamasa)

#### Role of protozoan grazing in relieving iron limitation of phytoplankton

Katherine Barbeau, James W. Moffett, David A. Caron, Peter L. Croot and Deana L. Erdner

*Nature*, 380:61, March 7, 1996

#### 文献情報

#### 酵母が飢餓状態で長期にわたり生き延びるためのメカニズム

栄養豊かな環境から、いきなり栄養の乏しい環境へ移ることは、他の微生物同様、酵母 *Sacharomyces cerevisiae* にとっても頻繁に起こりうることであり、いかにして飢餓状態を生き抜いて行くかは、酵母の生存にとって極めて重大な問題である。

酵母は栄養が制限されるようになると、増殖を停止し、定常期 (stationary phase) に入る。定常期の酵母は、対数増殖期の酵母と比較し、栄養の補給が全く無い条件下で生き延びて行くための生存性が飛躍的に向上していることが知られている。定常期に入った酵母がどの程度長期にわたって生存力を維持するのか詳しくは知られていないが、ある例では、イギリス海峡の底に175年間沈没していた船の中のビール瓶より酵母を生き返らせる

ことができたとの報告もある。

この定常期への移行は外見上ただ細胞の代謝を閉鎖するだけのように見えるが、最近の研究によると、定常期に入る工程は、細胞の分裂を休止した細胞が長期にわたり生き延びてゆけるようにするためのプログラムを活性化する、複雑で高度に制御された工程であることが明らかとなってきた。

さて、グルコースをベースとした栄養培地で30°Cで酵母を培養した場合、植菌後の4～7日後にタンパク合成速度、タンパク修飾、遺伝子発現の際立った変化が観察されることより、この時期にダイナミックな生理的变化が起こり、定常期に入るものと推察される。定常期でのタンパク合成は対数増殖期の0.3%までに減少するが、非常に多くの数のタンパクが培養開始4週間後でも合成されており、そのタンパクのパターンは対数増殖期のそれと驚くほど似かよっているらしい。なお、タンパク合成阻害剤シクロヘキシミドを使った実験により、それらタンパクの合成が、定常期の酵母の生存性維持には必要であることが示唆されている。

定常期から細胞分裂への復帰変異株として、GCS1とSED1の2つの遺伝子に変異を持つ株が取られている。この株は、一度定常期へ入ると、低温では細胞分裂に復帰できない株であり、最近の研究では、GCS1が低温における細胞分裂に復帰が必要であることが示された。このGCS1はZn-フィンガータンパクであるが、このタンパクはDNA結合タンパクではなく、タンパクの分泌に関係するGAP関連タンパクであることが明らかとなってきた。その他分泌に関連するいくつかのタンパクが、定常期の生存性に必須であることが報告されている。これらのことより、分泌関連の変異株は、定常期の生存性というより、むしろ定常期からの復帰に欠損のある株である可能性も考えられる。

さて、栄養源の欠乏には炭素源や窒素源の欠乏、その他様々であるが、これらの違いにより酵母は違った応答をする。例えば、非発酵性炭素源で培養した株を窒素飢餓にすると、2倍体酵母は孢子を形成するようになり、グルコース存在下で窒素飢餓にすると酵母は偽菌糸を形成するようになる。一方、最近の研究では炭素源の欠乏のみが、酵母を定常期での高い生存性の確保に導くことが明らかとな

ってきた。また炭素源の存在のみが酵母細胞を定常期より細胞分裂期へ脱出させるプロセスへ導くものであることも明らかとなった。M. Wernerらは酵母の増殖停止や生存性に関する近年明らかとなった一見矛盾するいくつかの知見を説明するモデルとして、酵母が定常期にいたる経路には2つの段階があるという興味あるモデルを提案した。このモデルによると、酵母は様々な栄養源の制限で第1のステージであるG0停止に至り、この段階から細胞分裂期への再脱出には先のGCS1タンパクの機能が必要である。一方、定常期は第2段階目のステージであり、炭素源の欠乏のみが第1段階よりこのステージに入ることを導き、逆に炭素源の存在がこのステージからの脱出に作用する。このモデルでは炭素源の制限は、酵母をG0停止させ、さらに次のステージである定常期へ至らせる両方を行うこととなる。

今後はこのモデルを中心にした様々な遺伝的解析により、酵母が定常期へ至り、脱け出すための仕組みが解明されていくことが期待される。

(抄訳 家藤治幸—国税庁醸造研究所)

(IEFUJI Haruyuki)

#### Stationary phase in *Sacchromyces cerevisiae*

M. Werner-W., E. L. Braun, M. E. Crawford and V. M. Peck

*Molecular Microbiol.*, 19: 1159-1166 (1996)

#### 文献情報

#### 高等植物で最も半減期の短いSAUR-ACI遺伝子の不安定性に關与する配列

遺伝子発現の制御に関する研究はこれまで翻訳制御系に比べ、転写制御系に注目が集められ、分子生物学的解明が進められてきた。遺伝子発現制御には多くの因子が作用しているが、ある特定のmRNA発現レベルは合成と分解のバランスによって行なわれていると考えられ、mRNAの代謝制御を知るためには翻訳制御系を解明することが重要であると思われる。高等植物でも、mRNAの安定性と遺伝子発現制御との関係に關心が寄せられている。植物は外界の環境の変化に対して、

遺伝子発現を迅速に変化させることによって代謝をコントロールし、対処しているため、mRNAの安定性の研究は細胞増殖、発生、分化を含めた植物の生体制御を解明するうえで重要な意味を持つと思われる。

mRNAの安定性を調べるうえで注目を集めているのは生体内で半減期の短いmRNAである。small-auxin-up-RNA (SAUR)はsoybean, *Arabidopsis*などでオーキシンによって発現され、植物では最も半減期の短いmRNAである。SAURの生体内での機能は不明であるが、オーキシンによる細胞伸長に関与しているものと考えられている。多くのmRNAの半減期は、数時間程度であるが、SAURは発現後10~50分程度で分解される。mRNAの不安定化を決定する要因として、動物細胞では3'非翻訳領域に存在するAU-rich配列が有名で、植物でもこの配列がmRNAを不安定化することが示唆されているが、SAURでは認められていない。

GreenらはSAURの不安定性を決定している配列を調べるため、*Arabidopsis*のSAUR-AC1遺伝子の各領域がmRNA蓄積に与える影響を調べた。筆者らはCaMV35Sプロモーター下流にSAUR-AC1のコード領域およびRBCS-E9geneの3'非翻訳領域を連結したキメラ遺伝子を作成し、同様に35Sプロモーター下流に $\beta$ -globinのコード領域、RBCS-E9の3'非翻訳領域を連結したキメラ遺伝子をアグロバクテリウムを介してタバコに形質転換し、これら遺伝子のタバコでのmRNA蓄積を調べた。その結果、SAUR-AC1のコード領域を含むキメラ遺伝子の蓄積は $\beta$ -globinのコード領域を含む遺伝子の1/4程度であった。同様に、35Sプロモーターに $\beta$ -globinのコード領域、さらに下流にRBCS-E9の3'非翻訳領域またはSAUR-AC1の3'非翻訳領域を連結したキメラ遺伝子をタバコに形質転換し、mRNAの蓄積を調べたところ、SAUR-AC1の3'非翻訳領域を含むキメラ遺伝子の蓄積は大幅に減少した。これらの結果より、SAURのコード領域、

3'非翻訳領域ともmRNAの蓄積の減少に関与していることが考えられた。

このことから、筆者らはSAURのコード領域または3'非翻訳領域を含むキメラ遺伝子のmRNA蓄積の減少がmRNAの安定性の減少によると考えた。テトラサイクリン処理により転写の抑制が可能なTop10プロモーターシステムを用い、SAUR-AC1の領域を含むmRNAの半減期を測定した。Top10プロモーター下流に $\beta$ -globinまたはSAUR-AC1のコード領域、さらに下流にRBCS-E9またはSAURの3'非翻訳領域を連結し、タバコ培養細胞に形質転換し、テトラサイクリン処理でmRNAの転写を停止させた後、細胞内のmRNA減少量を経時的に測定した。その結果、SAUR-AC1のコード領域を含む、キメラ遺伝子では半減期の低下は認められなかったが、SAUR-AC1の3'非翻訳領域を含むキメラ遺伝子では半減期が大幅に低下した。これらの結果よりSAUR-AC1の3'非翻訳領域にはmRNAの不安定性を決定する配列が存在する可能性が示唆された。

興味深いことに、SAURの3'UTRにはDST (downstream) elementと呼ばれている40bp程度の配列の存在が知られている。DST elementの役割は不明であるが、この配列は今のところ植物に特有なもので、タバコではDSTをdimerに組み込むとmRNAの半減期が大幅に低下することが報告されている。今後、DST配列およびSAUR-AC1の3'非翻訳領域がmRNA分解に果たす役割を解明することが期待される。

(抄訳 大野 浩一(東北大農))

(OONO Hiroshi)

**Multiple regions of the *Arabidopsis* SAUR-AC1 gene control transcript abundance: the 3' untranslated region functions as an mRNA instability determinant**

Gil, P. and P. J. Green

*EMBO J.*, 15: 1678-1686 (1996)

海外便り

## カナダでのコムギ雪腐病抵抗性に関する研究

農林水産省 東北農業試験場  
中島 隆

### 1. はじめに

昨年3月より1年間、科学技術庁長期在外研究員として「作物の受ける低温ストレスが病害抵抗性の発現と衰退に及ぼす影響の解明」のテーマでカナダ・アルバータ州にあるレスブリッジ研究センターのD. A. Gaudet博士と共同研究を行う機会を得ました。本研究所はカルガリーの南約240kmに位置し、西部カナダの穀倉地帯の中心にあります。年降水量は400mm程度の半乾燥地帯ですが、ロッキー山脈の伏流水を利用した灌漑施設が整備され、この周辺でとれる小麦はパン用として世界の品質を誇ります。夏期は避暑に最適な穏やかな気候ですが、冬の寒さは厳しく、滞在中の最低気温は $-30^{\circ}\text{C}$ を超えました。さらに、厳冬期にはフェーン現象に似たChinookと呼ばれるロッキー山脈から吹き下ろす温風のために、 $-30^{\circ}\text{C}$ の最低気温から一夜空けると最高気温が $+15^{\circ}\text{C}$ にまで激変することが頻繁にあります。このような立地条件を反映して、作物の耐寒性と雪腐病抵抗性に関する研究が精力的に行われています。

### 2. 雪腐病とは

積雪下でのみ植物を侵害する特異な生態を持った菌類によって起こる病害の総称で数種類の病原菌が関与します。日本を含む北方圏では冬作物の最重要病害です。本病の抵抗性はgene for gene theoryが成立する真性抵抗性(感染の有無で区別可能)はなく、圃場抵抗性(量的抵抗性)のみです。真性抵抗性は遺伝子レベルで解析が進み、病原菌が持つ非

病原力遺伝子や作物の持つ抵抗性遺伝子のクローニングが既に一部の系で報告されています。しかし、圃場抵抗性を物質レベルや遺伝子レベルで説明した例は世界的にもまだありません。私はこの困難かつ重要な課題にチャレンジしています。

### 3. 個体レベルの抵抗性の発現と衰退

今までコムギと紅色雪腐病菌(*Microdochium nivale*)の系を用い、まず抵抗性を定量的に評価する手法を開発し(*Can. J. Bot.* 68:343-346)、次に抵抗性の変化を播種から雪解けまで追跡してきました(*Can. J. Bot.* 72:1211-1215)。また、グロースチャンパーを用いた試験で初期生育量、ハードニング温度、日射、日長時間等の環境条件が抵抗性発現に及ぼす影響を解析しました(*Can. J. Bot.* in press)。これらの個体レベルの研究から雪腐病抵抗性は環境条件によって左右され、品種間差を議論する場合は抵抗性を生態的にとらえる必要がわかりました。つまり、発現と衰退のパターンが品種の地域適応性を反映しているのです(図1)。また、抵抗性に関与している物質をとらえる場合は3段階に分けて考える仮説を立てました(図2)。初期

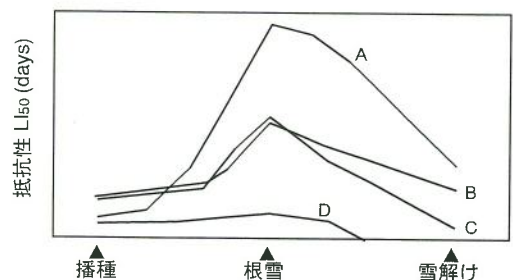


図1 抵抗性進展曲線に基づく品種(A~D)の類型化  
LI<sub>50</sub>: 50%個体枯死日数

NAKAJIMA Takashi

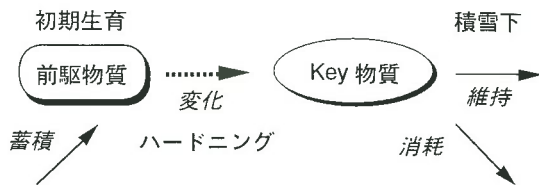


図2 雪腐病抵抗性に関する作業仮説

生育により蓄積された前駆物質がハードニングにより KEY 物質に変わり、それが積雪下で消耗されることにより融雪後の抵抗性の差として表れると考えています。KEY 物質が何であるかをつかみ選抜や体質診断に応用することが次のステップです。

#### 4. 植物にもアポトーシス？

とはいっても、圃場抵抗性を物質レベルで説明するのは容易なことではありません。そこで、鍵になる物質をつかむためのメルクマールになる現象を把握すべきと考えました。雪腐病研究のパイオニアである Bruehl が積雪下でのコムギの生存戦略として葉を犠牲にして生長点がある冠部を守るとする仮説を 1971年に発表しています。この仮説が本当ならば葉から冠部へ移動している物質がポイントとなるはずで、彼はまた、炭水化物の葉から冠部への移動が根雪開始 4 週間の間に起こるとし、圃場では抵抗性品種の方がクロロフィル含量が早く減少することも観察しています。しかし、Kiyomoto (1987) は糖の詳細な分析を行い非構造的炭水化物の移動は抵抗性品種に見られる葉の老化と関係ないとし、Bruehl の仮説を否定しています。ところで、植物生理の分野では植物の老化と死の過程でクロロフィルの分解がどういう役割を持っているのか不明で生物学的謎とまで言われています (Hendry 1988)。Bruehl の仮説は医学で最近ホットな研究課題となっているアポトーシス (個体の生存のためにプログラムされた細胞の死) の植物版といえます。そこで我々はこの仮説を再評価するところからスタートしました。

#### 5. 抵抗性関連物質の探索

まず、Bruehl が圃場で観察したことを再現するために、葉の先端部または冠部にのみ紅色雪腐病菌を接種する実験系を考え、病斑長の追跡と侵入部位の電顕観察、クロロフィルの分解過程の追跡をしました。また、冠部から RNA を抽出し抵抗性に関連するといわれる酵素の発現の有無を調べました。侵入過程を走査電顕で観察したところ気孔感染が中心で、角皮侵入は認められませんでした。また、葉への侵入率や病斑長には品種による差がありませんでした。つまり、葉では抵抗性に違いがないということです。次に、ハードニングした植物を  $+0.75^{\circ}\text{C}$ ・暗黒下でインキュベートするとクロロフィルの分解が観察されました。さらに興味深いことに、紅色雪腐病菌を接種して、 $+0.75^{\circ}\text{C}$ ・暗黒下に 90 日置いた場合、接種前にハードニング処理してクロロフィルが分解して黄化した個体の方が生存して、ハードニング無処理の緑の残っている個体が全て枯死しました。つまり、クロロフィルの分解が抵抗反応に関係しているような現象がつかめました。無ハードニングでは  $+0.75^{\circ}\text{C}$  でインキュベート 90 日後でもクロロフィルの分解は極わずかですがハードニング処理をした区では分解がかなり進んでいました。また、抵抗性極弱の品種が分解が遅いこともわかりました。ハードニング処理により積雪下でのクロロフィル分解能が誘起されることについてはこれが初めての報告です。クロロフィルの分解産物の中に抗菌物質が幾つか報告されていますので、今後は雪腐病罹病コムギでも抗菌活性物質が生成されているか検討していく予定です。同じサンプルを用いて冠部から mRNA を抽出し peroxidase, chitinase,  $\beta$ -1, 3-glucanase, PR-1 a および sucrose synthetase についてノーザンブロット分析しました。その結果、前 4 者のタンパクをコードしている mRNA が葉の先端部への病原菌接種により冠部で誘導されていました。これらはハードニング単独処理でも誘導されました。しかし、sucrose synthetase は

ハードニングによってのみ誘導され、接種による変化はありませんでした。今後は、これら PR protein (感染特異的タンパク質) の情報伝達に関与しているとされるサルチル酸およびジャスモン酸の分析を行う予定です。

現在までのところ、これらの物質とコムギの雪腐抵抗性は相関関係で議論しているに留まります。直接の因果関係を証明できる実験材料が是非とも必要なことがわかりました。今後は、耐凍性で行われているような dihaploid 系統を材料にして分子マーカーを使った QTL 分析を進める必要があります。

#### 6. カナダの研究体制

残された紙面で在外研究で感じたことを述べます。まず、研究所の施設や備品に関しては日本の方が表向きは完備していると思われました。しかし、基本的設備であるグロースチャンバーが極めて充実していて、150台の大型チャンバーを24時間体制でテクニシャンがメンテナンスを担当していました。電顕、統計、図書館司書、グラフィックデザイン、テクニカルエディター等の圃場以外の研究サポート部門の充実が日本とは最も異なると感じました。私の勤務する日本の試験場では高額な分析機器はあるものの、テクニシャンがい

ないために有効に働かず、そのうえグロースチャンバーが貧弱なため、分析するためのサンプルがうまく作れないというお粗末な状況です。また、カナダではコンピューターネットワークの利用が進んでいて、オフィスのパソコンからテクニシャンに指示を出すことが出来ました。このように日本と比較すると夢のような環境ですが、厳しさもひとしおです。研究者は予算取りと報告のレポート作成に忙しく、自分で実験はほとんどできません。また、日本の経常研究費に相当するものではなく、全て自力でプロジェクトを立て研究費を調達し、ポスドクやテクニシャンを雇わなければなりません。当然評価も厳しく一人平均4~7報以上の論文を1年間に書いているそうです。研究者の平均年齢は高く、ここ5年間新規採用がないとのこと。驚いたことに、昨年3月、カナダ政府が歳出削減のため国立研究機関の研究員を20%減らす計画を提示しました。これに伴い、多くの退職と人事異動が発表され、かなりの混乱がありました。このような厳しい状況の中に第3者として存在した自分を幸運に思うと同時に、日本の研究体制に関して深く考えさせられる滞在でした。最後に貴重な在外研究の機会を与えていただいた方々にお礼申し上げます。

#### 編集後記

まずは生研機構10年おめでとうございます。31号から45号まで BRAIN TECHNO NEWS の編集に携わったのですが、楽しく、編集の仕事やらせていただきました。

私が編集を担当した時期は、バブルがはじけバイオブームも終息を迎えつつある時期で、本誌も役割と内容を問い直された時であった。起死回生のホームランをと思いつつも、素人で凡人の悲しさ、暗中模索を繰り返すばかりで、有効な手も打てず、徒に時が過ぎていった。旧来の「地味でも中味が一番」から、「外見だって大事。読者に手にとってもらわなければ」と路線変更、乏しい予算をやりくりし、表紙をカラーに装丁をハードに化粧直した。トピックの集合体から、各号毎にテーマ

を設定した特集号を中心にしたこと等が記憶に残っている。いずれも成功したとは言いがたいが、「変わらなきゃ」という担当者の意図だけは読者に汲み取っていただけたのではないだろうか。(陰の声：少しも変わってないよ) いずれにしても、読者が「読んでよかった。得をした。」といわれる雑誌でありたいものである。

話は変わるが、実は私、原稿の依頼は気軽に引き受けるくせに締切に遅れる常習犯であったのだが、原稿が遅れることが編集者の精神衛生に如何に悪いかを身をもって知り、締切は守ること堅く決心したのであった。ところが、喉元すぎれば……。この原稿も遅れて矢の催促が。  
(岩井純夫)

## ブレインテクノニュース (第57号)

平成8年9月15日発行

発行者 眞木秀郎

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