

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 58 号

NOVEMBER 15, 1996

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution



竹林のそばで発生したキノガサタケ（栃木県葛生町，'96年7月24日）
地表から頭部までの高さは約20cmあり，白いレース状の菌網（マント）が
地表に接するほどに拡がる。（本文22ページ参照）

発行=生物系特定産業技術研究推進機構

総 説

北本 豊

きのこの遺伝特性と最新の育種技術…………… 1

国内情報

大杉 立

ソース葉のショ糖合成系改変によるジャガイモの収量増大の可能性…………… 5

石田 功

動物細胞由来2-5Aシステム導入植物…………… 9

川田弘志

線虫の絶対寄生細菌パストリアは実用に供せるか……………12

高橋昌志

コメットアッセイ法を用いた単一初期胚のDNA損傷の検出……………16

後藤 誠・寺沢真人・湯川英明

2種酵素共存反応系によるL-アスパラギン酸製造法……………19

地域の先端研究

武田夕香

キヌガサタケの栽培……………22

文献情報

マルトースの新しい製造法への挑戦

—生デンプンを分解する新規 β -アミラーゼの精製—……………25

受精時にはたらく精子内のタンパク質……………26

異種グルコアミラーゼを生産する新規パン酵母の育種……………27

アグロバクテリウムのT-DNA転移と線毛形成……………28

海外便り

木村幸敬

中鎖脂肪酸の有する腸管吸収促進機構の解明

—スエーデン ウプサラ大学での1年—……………30

きのこの遺伝特性と最新の育種技術

鳥取大学農学部

北本 豊

きのこの細胞は半数体の異種核が1細胞に2核以上共存するヘテロカリオンであり、動植物の細胞系に適用できる遺伝法則が通用しないことが多い。本稿では、きのこ特有の二核細胞系の遺伝特性解明の試みと、エノキタケの子実体の形態や色に関する育種、菌糸の培養期間短縮とコスト低減につながる高温生長性品種や収量性の高い品種などの育種を事例として、交配を主とする最近の実用育種技術を概括する。

1. はじめに

食用および薬用きのこの生産では、優良種菌と卓越した生産技術により良品質きのこを安定、安価に生産することが求められる。きのこの生産技術において、「機能学」的考えを適用すると、育種と栽培技術の有機的結合に基づく種菌開発が望まれる。きのこ種菌の開発は、当初の野生株の栽培化と栽培品種化、それにつづく交配による品種改良が主な流れである。原品種として活用すべき親株の好ましい遺伝形質を子孫の交雑株に集めて発現させることが育種であり、きのこの品質にかかわる形質、栽培工程の環境制御にかかる生理学的形質の改良が品種開発の最も重要な課題である。きのこの品種は変異しやすいことが経験的に知られているため、遺伝的安定性も実用品種としての前提条件である。

従来、きのこの育種では、多数の交配株を作出し、栽培試験で評価する方法が適用されてきた。これは、きのこの細胞が半数体の異種核を細胞当たり2個以上（子実体の細胞はさらに多核である）保有するヘテロカリオンであるため、単核で倍数体の核の細胞系に適用される遺伝法則が通用しないことが多く、遺伝学的知見も極めて希薄であることによる

ものである。本稿では、きのこ特有の二核細胞系の遺伝特性の解明の試みと、交配を主とした実用育種技術の展開について紹介したい。

2. きんこの二核細胞と遺伝特性

きのこの有性生殖サイクルは、単相(n)の担子胞子が発芽して一核菌糸ができることから始まる¹⁾。一核菌糸は生長してコロニーを作り、その先端部の菌糸が不和合性因子構成(交配型)において互いに和合性を示す別の一核菌糸に遭遇すると接合が起こり、1細胞に交配型の異なる2種の核を保持する重相(n+n')の二核菌糸ができる。二核菌糸は、栄養菌糸とも呼ばれ、大半が1細胞に異種の2核を有するが、核数の異なる多核細胞も混在する。菌糸は分裂を重ね、栄養菌糸体コロニーが発達する。子実体形成のための内外の環境条件が整うと、栄養菌糸体からきのこの発生が始まる。子実体の発育が進むと、ひだの部分に担子器が形成され、ここで2核が融合して複相(2n)となり、減数分裂が起こり、4個の担子胞子が形成される。

きのこの二核細胞の細胞分裂は、核分裂に先立って細胞側壁にクランプが形成され、1核は細胞主構造内で、他の1核はクランプに入って核分裂が並進し、隔壁の形成後、クランプ内壁が溶解してうしろの細胞にクランプ

内の1核が移動して完成する(図1)。しかし、共役核分裂、すなわち細胞分裂における2核の遺伝的相互制御の仕組みは全く解明が進んでいない。一核菌糸の核には子実体を作るために必要な遺伝子セットが備わっており、どの交配型の一核菌糸でも子実体を作る基本的能力を有している。したがって、二核交配株では生殖器官形成に必要な遺伝子が2セット、別々の核に備わっていることになる。著者らは、最近、ナメコを実験系として共役核分裂における二核細胞の2つの核の挙動の決定に遺伝的上下性があることを報告した²⁾。上下性を決定する遺伝形質は、担子胞子の形成に先立つ減数分裂により均等に分離する。交配において作られた二核菌糸の遺伝形質の発現において、それぞれの核の遺伝的相互作用の解析が期待される。一核株を交配すると、細胞質因子がいずれかの親株に由来する2種の交雑株が得られる。細胞質因子の二核株の遺伝形質発現への影響も若干知られている。

3. 交配技術の方法論

きのこの交配は、半数体の一核菌糸に対して和合性を有する別の一核菌糸を接合させ、二核株を作るプロセスである。交雑株がそのままきのこ栽培の種菌として利用される。

a) 一核株の取得

育種の第1段階は、交配に用いる一核株を子実体から単胞子分離により作ることである。きのこは、通常、1個の担子器上に4個の胞子を作るが、胞子は、シイタケのような4極性のきのこでは4種類、ナメコのような2極性では2種類の交配型に分離する。しかし、胞子の遺伝子構成の違いは不和合性因子だけではない。胞子形成では、減数分裂において染色体組換えを生じるため、交配型因子は2あるいは4種類でも、他の遺伝子構成がそれぞれ異なる胞子が無数に形成される。例えば、同一子実体からの単胞子分離による一核株の生長最適温度特性は正規分布に近い連続的な変異を生じ、その他の計量形質でも類似した分布を示す³⁾。したがって、優良株を作るに

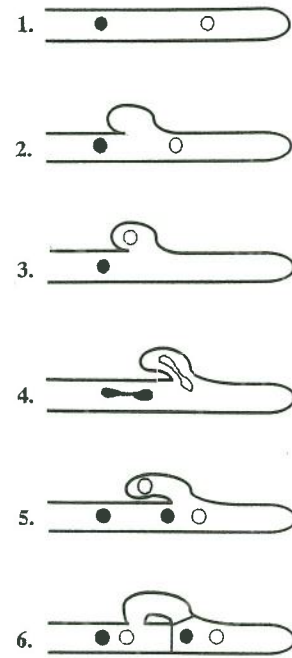


図1 きのこの二核細胞の共役核分裂

は出来る限り多数の一核株を用いて交配を行う必要があり、作業は膨大となる。この効率化には、経験的に推測した一核株の遺伝特性が活用できる。

b) 不和合性因子

きのこの交配は、不和合性因子が相補的な2菌株の組み合わせが前提であり、一核株の交配型の分析は育種の効率化に不可欠なプロセスである。不和合性因子は胞子の発芽率などと連鎖があり、一核株の分離において、取得しやすい交配型と取得しがたい交配型がある⁴⁾。有効に交配を行うためには、後者の分離に努力を必要とする。エノキタケなどで、不和合性因子と一核株の菌糸生長やコロニー形態に連鎖が見られる。後述するように、交配型に着目した育種の効率化も可能である。

c) 交配

きのこの交配では、同一子実体由来の一核系統株同士の自殖交配と異品種の一核系統株間の他殖交配が基本である⁵⁾。他殖は自殖より変異の幅が大きい。現行品種の改良には、自殖交配または現用品種を母体とする *Di-Mon* 交配(二核と一核菌糸の交配)が利用できる。また、2つの一核株の対峙培養の両側から分離できる2種の二核菌糸の遺伝特性は、細胞質因子の影響で多少異なる。ただ、

その差異は大きなものでないため、菌糸生長の良い側から分離した交雑株で当初の栽培試験に用い、優良株として選別に残った場合に、正逆交配株の比較試験すれば、効率化が図れる。交配の成果は、偏に親株の二核株、一核系統株の数と栽培試験に比例するものである。交配後に交雑株から優良株を効率的に選別する方法の開発がきわめて重要である。

交配型が相補的でない1核株間で交雑株作出が可能な細胞融合法は交配の一方法といえる。しかし、菌糸体からプロトプラストを作ることによって変異 (somaclonal variation) が期待できる反面、作業効率が極度に悪いため、ほとんど活用されない。

4. 交配株における形質発現

きのこの品種開発では、子実体の品質が遺伝形質として重要であるが、さらに高温性で菌回りが速く収量性が高い栽培特性などが育種目標となる。バナシメジなどでは、味に関する因子の評価が必要となる。きのこの育種学をサポートする遺伝学的基盤の確立が不十分であるため、形質発現を経験的に解明して活用することが実用技術として必要とされる。いくつかの育種事例を以下に挙げる。

a) 高温菌作出の経験則

きのこの高温生長性品種の開発は、栽培施設のコスト低減に対応するものである。エノキタケでは一核株を交配型で分別すると、A2因子を有する株がA1因子株より格段に高温性を示す⁹⁾。一核株を温度特性により高温(H)、中温(M)、低温(L)性に区分して交配すると、H×Hで他の組み合わせより高い約65%の交雑株が高温性を示した。高温性株同士の交雑では、A1B1×A2B2の交配で高温性株の作出比率が80%以上、A1B2×A2B1では50%であった。したがって、高温生長性品種の育種には交配型の選別を活用することが可能である。著者らは、生長最適温度が従来品種より3°C高い26°Cの高温性株の作出に成功している。高温性一核株の選別と育種への活用は、他の食用きのこでも進んでいる。

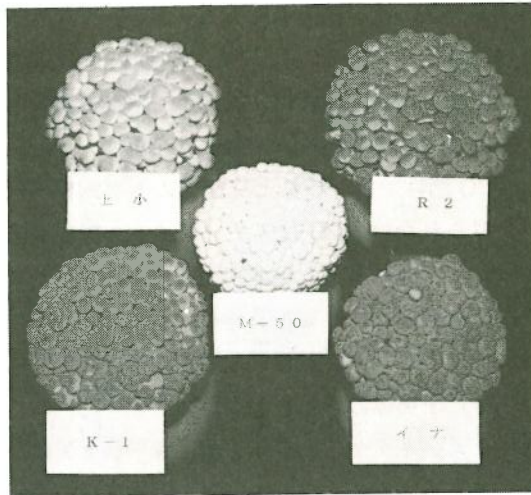


図2 光照射下で栽培したエノキタケ各品種の着色

b) 純白系エノキタケの育種

エノキタケ野生株や在来品種は、光照射下で栽培すると黄褐色のきのこを形成する(図2)。昭和20年代末に遡る本菌の栽培初期には、子実体の着色を遮光で避ける栽培技術が汎用されたが、その後菌株の選抜により、きのこの淡色化が進んだ。著者らは、本菌の交配による品種開発に取り組み、60年代初めに、光照射下でも着色しない革新的新品種を作出した⁹⁾。

純白系品種の白さはアルビノではなく、酵素の機能にある⁹⁾。野生株はフェノールオキシダーゼ(PO)活性が高く、光の作用により着色する。本酵素は子実体発生に関与し、低活性の交雑株は低収量性を示す。一方、純白系品種は色素形成能力を欠くものではなく、野生種より比活性が高いものも作出できる。純白系品種の多くは在来着色種より高い細胞内還元能を示し、これはスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の比活性の高さに相関する。子実体白色化は、着色反応系と還元反応系のバランス、すなわち、PO/SOD活性比の低さに相関すると推測される。この特性を保有する特定一核株間の交配で、純白系交雑株が作出できる。作出した白色性交配株で継代培養中に着色株に復帰するものがある。

c) 酵素活性の発現例

二核株の酵素活性発現の違いは、エノキタケの2つの一核株の対峙培養で分離できる正

逆交配二核株間でさえもエステラーゼサイモグラムの違いとして観察できる。SOD 活性の交雑株での発現は、親株の二核株で高いものは交配株で同等以上の活性を示す。一方、PO 活性では二核株と交配株の 1 次的相関は見られない。PO はアイソザイムを構成するためと思われる。培地利用性の向上を図るための育種では、セルラーゼ、リグニナーゼ活性などの向上が課題となるが、知見に乏しい。

d) 子実体の形態と遺伝特性

エノキタケの子実体の傘は偏平型と饅頭型がある。傘の形態の遺伝性を調べる栽培試験では、供試した二核菌糸株に、交配により饅頭型を形成する因子を保有すると推測されるものが多かった。しかし、これらと特定の二核株では偏平型が発現する場合が見られ、いずれかの二核親株の遺伝形質を優先して発現させる何らかの法則があるように思われる。

5. おわりに

本稿では、きのこの遺伝特性と育種技術の一部を紹介するにとどまった。上述のように、現行の育種技術は遺伝学的裏付けが不足しており、それぞれの企業あるいは研究機関とも独自の経験則に頼るところが大きい。しかし、

それでも育種目標をクリアする遺伝特性を備えた品種開発が、シイタケ、エノキタケ、ブナシメジなど多くのきのこのこで着実に進展している。遺伝学あるいは育種学の基礎的領域は公的研究機関を主体とした展開が必要であり、組織的研究の企画と展開を期待したい。交配により作出された品種の遺伝的安定性も最重要課題の一つであるが、紙面の都合上、ほとんど記述しなかった。末尾の文献⁷⁾をご参照いただくと幸いである。

文 献

- 1) 北本 豊・鈴木 彰(1993)：古川久彦編、きのこの学、pp.221-229. 共立出版
- 2) Masuda, P. *et. al.* (1995) *Mycoscience*, 36 : 413-420
- 3) Masuda, P. ら (1995) 日菌報, 36 : 143-151
- 4) 北本 豊 (1993) '94年度版きのこ年鑑, pp.55-62. 農村文化社
- 5) Kitamoto, Y. *et. al.* (1993) *Genetics and breeding of edible mushrooms*, Ed. Chang, S.T. *et. al.* Gordon & Breech Science Publishers. Philadelphia
- 6) 下鳥 彰・北本 豊 (1994) きのこ技術集談会 第 6 回大会講演要旨集, p.34
- 7) 北本 豊 (1966) きのこ技術集談会 第 12 回技術研修会講演要旨集, pp.20-22

国内情報

ソース葉のショ糖合成系改変による ジャガイモの収量増大の可能性

農林水産省 農業生物資源研究所

大杉 立

組換え DNA 技術を利用して作物の乾物生産、収量の向上を目指す試みが進められている。ソース器官（葉）におけるショ糖合成系の鍵酵素（SPS）は栄養生長に影響を与えることが知られているが、SPS をジャガイモで過剰発現させたところ地上部および地下部の乾物重が増大した。今後、圃場レベルで検証する必要があるが、組換え DNA による収量向上の可能性を示唆する結果といえる。

1. はじめに

バイオテクノロジー、とりわけ組換え DNA 技術の進展に伴い、特定の遺伝子を新たに導入したり、あるいは既に存在する遺伝子の発現を抑制することが可能になってきている。既に、イネに病虫害抵抗性を導入したり、トマトのフレーバーセイバーのように日持ちを良くした例が見られるが、乾物生産・収量に影響を及ぼす例は極めて少ない。当研究室では、物質生産力の向上に組換え DNA 技術を利用するという観点で研究を進めているが、ショ糖合成系に関わる酵素の改変を通じてその可能性が窺われる結果を得たので紹介する。

2. ショ糖合成系の役割

ソース器官である葉において、光合成で固定された炭酸ガスは一部はデンプンとして一時的に葉の葉緑体に蓄積されるが、他はショ糖のかたちで合成され他の組織や器官に転流される。イネの穂やジャガイモの塊茎のようなシンク器官に移行したショ糖は最終的な貯蔵物質であるデンプンに変換され、蓄積される（図 1）。ソース葉におけるショ糖とデンプン間の分配（炭素分配）は主にショ糖合

成系が支配していると考えられている。例えば、ショ糖合成はショ糖リン酸合成酵素（SPS）という酵素が主に律速しているが、SPS 活性の高い作物（コムギ等）では葉中のデンプンの量が少なく、逆に低い作物（ラッカセイ等）ではデンプン量は多い（負の相関）¹⁾。また、SPS 活性は炭素分配に関わるのみでなく乾物生産速度とも関連しており、トウモロコシの SPS 活性の高い品種は栄養生長期の乾物生産速度が高い傾向が認められる²⁾。このような SPS のもつ特徴は物質生産力そのものに影響を与える一つのターゲットとしての資格を有していると考えられる。このため、米国、ドイツそして我が国において SPS 遺伝子を外部から導入してその活性を上昇させ、ひいては物質生産力自身も向上させようとする試みが進められている。

3. SPS をジャガイモに導入する

これまで、当研究室を含めて SPS 遺伝子を導入した例としてはトウモロコシ由来の SPS 遺伝子をトマト、ジャガイモに導入した例とハウレンソウ由来の遺伝子をタバコ、ジャガイモに導入した例が知られている。ここでは有望な結果が得られている前者の例を紹介したい。トウモロコシ由来の SPS 遺伝子をトマトに導入した例は 2 つ報告されているが、最初の例では SPS 活性は 6 倍に上昇し、その直接的な結果として葉内のデンプン

OHSUGI Ryu

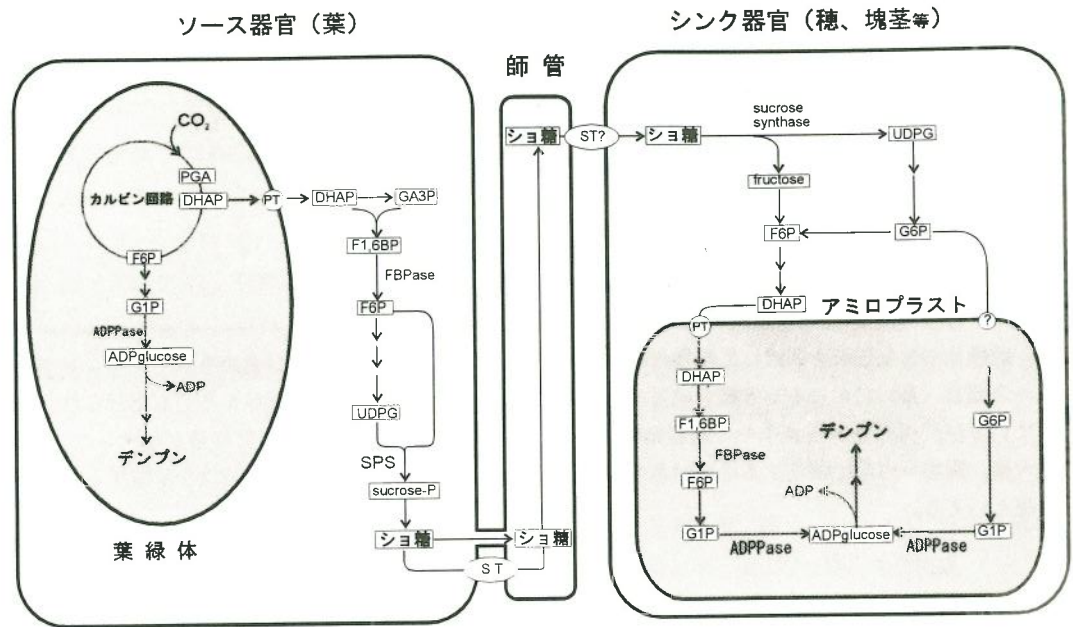


図1 ソース器官からシンク器官への光合成産物の流れを示す模式図

ADPPase: ADP グルコースピロフォスホリラーゼ, FBPase: フラクトース2リン酸フォスファターゼ, SPS: ショ糖リン酸合成酵素, ST: ショ糖トランスポーター

に比べてショ糖が増大した。また、乾物生産に対する影響としては、栄養生長期の地下部に比べて地上部の乾物重が多くなる傾向を示した³⁾。この結果は、SPS 活性の上昇は地上部の乾物生産に良い影響を与えている可能性を示している。もう1つの例では、同じ形質転換植物を高炭酸ガスの条件で育てた場合、SPS 活性は3~5倍に上昇し、光合成速度も20%上昇した。しかし、果実の数、重さともに影響を受けず非形質転換植物と同様であった。むしろ、光合成速度が同程度だった通常の炭酸ガス濃度の下で形質転換植物の果実重が増大した⁴⁾。これらの結果から著者らはSPS 活性や光合成速度が上昇しても最終的には高炭酸ガス濃度に順化してしまい、その影響がなくなるものと推察している。

当研究室では、トウモロコシ由来のSPS 遺伝子を35Sプロモーターに連結して、ジャガイモに導入した。ジャガイモは葉にデンプンを多量に蓄積する作物であり、SPS 活性の上昇でデンプンとショ糖への炭素分配をショ糖側に傾斜させることは転流効率の上昇、塊茎でのデンプン蓄積の増大を目指す上で意義が大きいと考える。トマトの例と比べると、導入作物の違いに加えてもう一つの違いはプ

ロモーター活性を上昇させるように加工した点である。このプロモーターは当研究所の大橋研究室で開発したもので従来の35Sプロモーターに比べて約10倍の高い発現を示す⁵⁾。導入はアグロバクテリウム感染で行った(当研究所大川研究室と共同)。得られた形質転換ジャガイモの当代とその塊茎から得られた次の世代(ジャガイモは栄養繁殖で増えるので正確には世代は進んでいないが、ここでは便宜上第2世代とよぶ)を解析した^{6,7)}。トウモロコシ由来のSPS 遺伝子は第2世代でも発現していることが確認されており、ここではこの第2世代の結果を紹介する。形質転換ジャガイモのSPS 活性は最大で4倍以上に上昇しており、その影響は葉内のデンプン量の減少に反映していた(図2)。つまり、SPS の過剰発現によって、デンプンを大量に葉内に蓄積するというジャガイモ本来の性質が変化したことを意味している。SPS の過剰発現はジャガイモの乾物生産にも影響を与えていた。地上部(葉+茎)の乾物重が増大しているもの(#3, 4)と塊茎の乾物重が増大しているもの(#2, 4)が見られた(図3)。ただし、今回の結果は1/5000aポットに栽培したもので、乾物重、特に、塊茎につ

いてはポットのサイズがマイナスに影響を与えている可能性がある。しかしながら、全体としてみるとSPS活性の増大が乾物重にプラスに影響を与えていることが窺える。この点については更に圃場レベルでの試験が必要と思われる。

今回得られた形質転換ジャガイモにはもう一つ大きな特徴がある。それは冷涼な気候を好むジャガイモに高温に適應しているトウモロコシのSPS遺伝子を導入したことである。トウモロコシのSPSの温度反応性は図4に見られるように35°Cまでほぼ直線的に活性が上昇するが、ジャガイモが本来もっているSPSは25°Cと35°Cではほとんど変わらない。もしトウモロコシSPSのこのような特徴がそのままジャガイモに導入されれば、ジャガイモに耐暑性を付加できる可能性がある。形質転換ジャガイモ(#4)におけるSPSの温度反応性は明らかにトウモロコシSPSの特徴を示していた。温度に対する植物全体の反応が一つの遺伝子の改変で変化すると考えるのは単純過ぎるが、重要な代謝の鍵になる酵素の温度反応性を変えることでその代謝全体の温度に対する応答が変化することもあり得るのではないだろうか。この点を明らかにするために形質転換ジャガイモの温度反応性を光合成、乾物生産等様々な面から検討する予定である。

4. ADPPase 活性上昇によるシンク能の向上

組換えDNA技術を利用して物質生産・収量に影響を与える改変の他の例としてはデンプン合成の鍵酵素であるADPグルコースピロフォスホリラーゼ(ADPPase)の過剰発現がある。1992年、ミシガン州立大学のブリースとモンサントのグループは大腸菌由来のADPPaseを塊茎特異的に発現するパタチンプロモーターに連結してジャガイモに導入したところ、ジャガイモのデンプン含量は約30%増大した⁸⁾。これは塊茎におけるシンク能の増大を目指したものであるが、予想通りの結果が得られたことはまさにADPPaseが

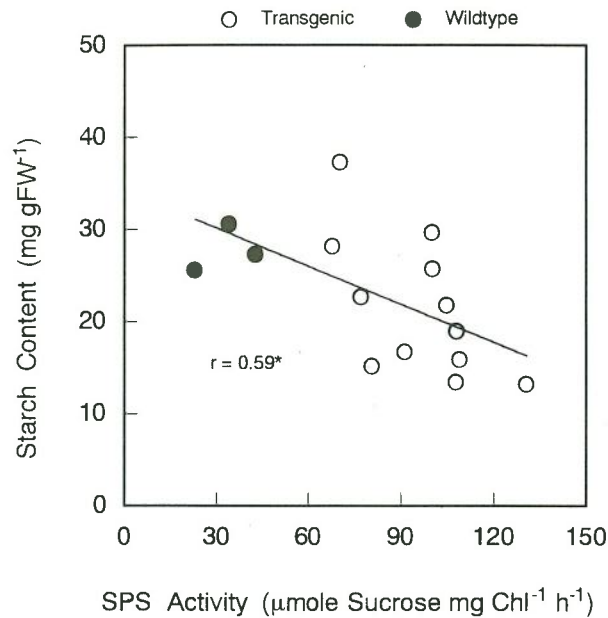


図2 形質転換ジャガイモのSPS活性と葉内のデンプン量の関係

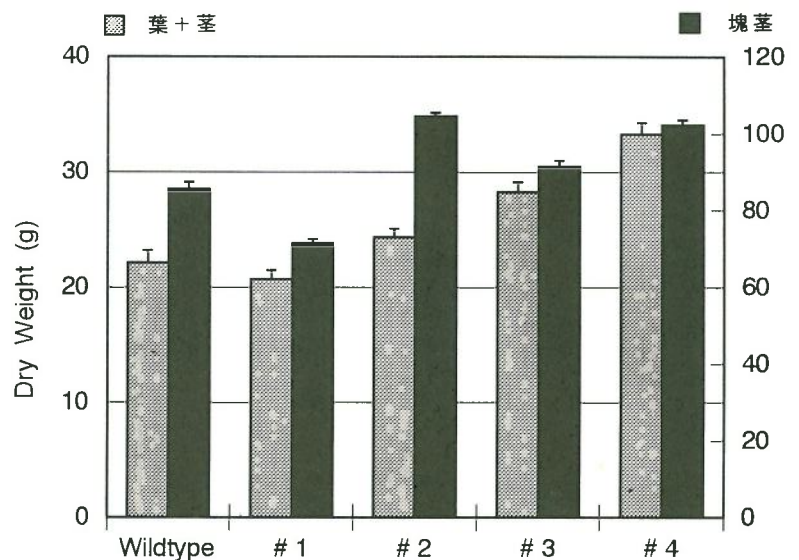


図3 形質転換ジャガイモの乾物重

デンプン合成を通じてシンク能を制御していることを示している。一つの遺伝子がシンク能全体に大きな影響を与えていること自体驚くべきことだが、次の問題は形質転換ジャガイモの優れた特徴が大規模な圃場試験でも維持できるかという点にある。モンサントはその後4年にわたって圃場試験を継続し、形質転換ジャガイモではいつでも塊茎の乾物重が20~30%高いことを明らかにした。この成果は今夏のアメリカで行われたゴードン研究会議で報告されたが、日本へもマクドナルドを通じて進出する予定との話であった。

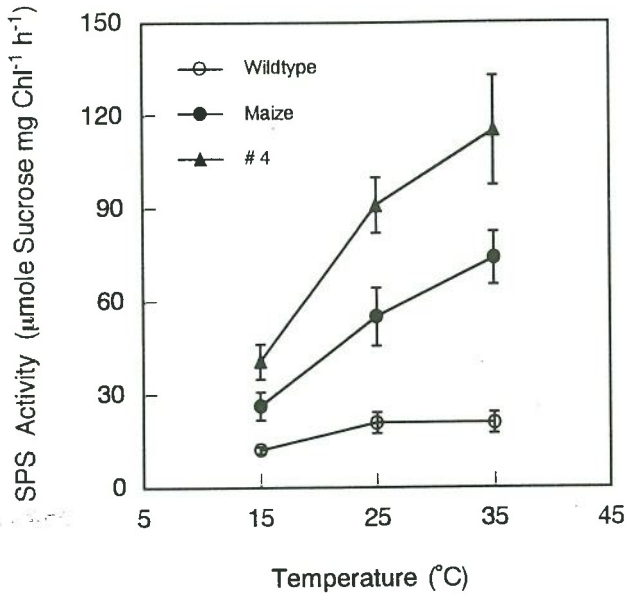


図4 ジャガイモ(野生型と形質転換植物#4)及びトウモロコシのSPS活性の温度反応性

5. おわりに

乾物生産、収量といった形質に数多くの要因が関わっていることはよく言われており、一つや二つの遺伝子を改変したくらいで収量が上がったりすると考えるひとは多くはない。しかし、これまで述べてきた結果からソース器官におけるSPS、シンク器官におけるADPPaseはその数少ない鍵となる遺伝子の候補と考えることができる。現在SPSとADPPaseの両遺伝子を過剰発現させた形質転換ジャガイモの作出が考えられている。また、光合成産物(ショ糖)はソースからシンクへは師部を転流して移動するが、特にソース葉から師部への移動にはショ糖トランスポーター(ST)と呼ばれるタンパクが大きな役割を果たす(図1)。したがって、ソース、シンクそれぞれの能力を高めると同時にSTの増強によるいわば転流能の向上も今後の重要なターゲットになるとと思われる。

ジャガイモの利点は、栄養繁殖であるため一度導入した遺伝子の影響がそのまま残ることであり、上述のモンサントの圃場試験がそのことを証明している。したがって、組換えDNA技術を活用した収量増の素材としてジャガイモは優れていると言える。しかしながら、我が国の基幹作物はイネである。また、世界的に見てもカロリーの50%以上はイネに頼っているとされており今後の食糧危機を乗り越えるためにも、イネの収量増は緊急の課題である。イネは種子繁殖であるため導入遺伝子の影響が後代で弱くなる傾向がある。しかし、アメリカを始めとしてオーストラリア、中国等が組換えDNA技術による収量増のターゲットとしてイネを考えていると言われている。我が国ではまだこのような観点で研究を進めているところは少ないが、早急にソース器官から転流系、シンク器官まで視野に入れた戦略的かつ組織的なイネの研究に本腰を入れて取り組むべきだと考える。

文 献

- 1) Huber, S. C. (1981) *Z. Pflanzenphysiol.*, 102: 443-450
- 2) Rocher, J. P. *et al.* (1989) *Plant Physiol.*, 89: 416-420
- 3) Galtier, N. *et al.* (1993) *Plant Physiol.*, 101: 535-543
- 4) Michalief, B. J. *et al.* (1995) *Planta*, 196: 327-334
- 5) Mitsuahara, I. *et al.* (1996) *Plant Cell Physiol.*, 37: 49-59
- 6) Tobias, D. J. *et al.* (1996) *Jap. J. Crop Sci.*, 65 (Extra issue 1): 102-103
- 7) Tobias, D. J. *et al.* (1996) *Jap. J. Crop Sci.*, 65 (Extra issue 2): 143-144
- 8) Stalk, D. M. *et al.* (1992) *Science*, 258: 287-292

動物細胞由来 2-5A システム導入植物

キリンビール基盤技術研究所

石田 功

2-5Aシステムは、インターフェロンによって動物細胞内に誘導される抗ウイルスタンパク質である。この系を導入したトランスジェニックタバコ植物は、ウイルス感染によって特異的に感染細胞が壊死する。この2-5Aシステムの植物への導入は、圃場でのウイルス感染による被害を最小限に留められる画期的な分子育種法になると期待される。

1. はじめに

ウイルス抵抗性は、イネ、麦、トウモロコシなどの穀物やジャガイモ、ニンジン、トマト、キュウリなどの野菜と同様に観賞用植物においても重要な育種目標である。ウイルス抵抗性植物の分子育種（組換えDNA技術を用いた育種）としては、ウイルス外被タンパク質、複製酵素の遺伝子を導入する方法が確立され、実用化されつつあり¹⁾。これらの方法には、以下のような問題点がある。

1) 複数のウイルスに対して抵抗性を賦与するためには、複数のウイルス遺伝子を導入する必要がある。2) ウイルス側の変異によって、オーバーカマーが出現する可能性が高い。3) 植物体においてメジャーなウイルスを抑えることで、未知のマイナーであったウイルスが植物体で新たなメジャーな病原ウイルスとなる可能性がある。4) ウイルス抵抗性植物自体がウイルスを保毒するために、ウイルス源となる可能性がある。

私達は、このような問題点をブレイクスルーできる新たなウイルス耐性賦与技術の開発を目指した。私達は、植物病原ウイルスの殆どのがRNAウイルスであり、これらは複製時に必ず二重鎖RNAの形態をとることに着目し、この二重鎖RNAを特異的に認識

し分解するようなタンパク質を植物で発現させることによって、植物にウイルス抵抗性を賦与するというアイデアを考えた²⁻⁴⁾。2-5Aシステムは、インターフェロンによって動物細胞に誘導される抗ウイルスタンパク質であり、2', 5'オリゴアデニル酸(2-5A)合成酵素(2-5Aase)と2-5A依存性リボヌクレアーゼL(RNase L)からなる。この2-5Aシステムは、RNAウイルスの複製中間体である二重鎖RNAによって特異的に活性化される(図1)⁴⁾。

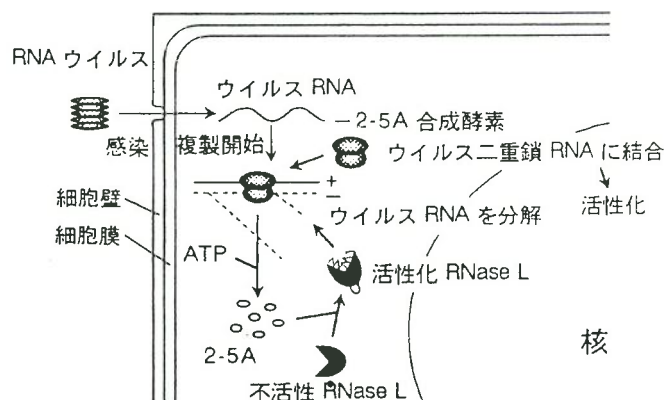


図1 2-5Aシステム

RNAウイルスが細胞に感染すると脱核して複製を開始し、複製中間体(二重鎖RNA)を形成する。2-5A合成酵素(2-5Aase)はこの複製中間体と結合し、活性化されATPを重合してオリゴアデニル酸(2-5A)を合成する。生成された2-5Aは不活性のリボヌクレアーゼL(RNaseL)と結合し、RNaseLを活性化する。活性化されたRNaseLは、感染細胞内のmRNAを分解してウイルス複製を阻害する。

2. 2-5Aシステム発現トランスジェニック植物⁴⁻⁵⁾

私達は、ヒト由来2-5Aase⁷⁾および

RNaseL⁹⁾ cDNA を報告されている塩基配列をもとにクローニングした。CaMV35S プロモーター下流に 2-5Aase または RNaseL cDNA をつなげた pBI 121 バイナリーベクターをそれぞれタバコ (*Xanthi nc*) へ導入して、2-5Aase 活性⁹⁾、RNaseL 活性¹⁰⁾を確認した後、両者を交配して F₁ 種子を得た。F₁ 種子を栽培して、非形質転換体タバコ、2-5Aase タバコ、RNaseL タバコ、2-5Aase+RNaseL タバコを選択して、ウイルス接種試験に用いた。これらのトランスジェニックタバコに CMV-Y (キュウリモザイクウイルス-Y 株) を接種したところ、2-5Aase+RNaseL タバコだけに接種葉で壊死斑ができ全身感染が阻止された。接種後 1 か月以上経過しても上葉には病徴は見られず、葉抽出液を用いた抗体によるウエスタンブロットによってもコートタンパク質は全く検出されな

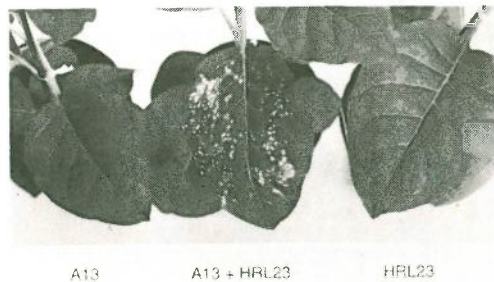


図 2 a CMV-Y 接種実験結果 (その 1)

CMV 接種後 5 日目の接種葉。2-5 Aase+RNaseL タバコ (A13+HRL 23) は、接種葉に壊死斑が見られる。2-5 Aase (A13), RNaseL (HRL 23) タバコでは、非形質転換体と全く同様に壊死斑は形成されない。

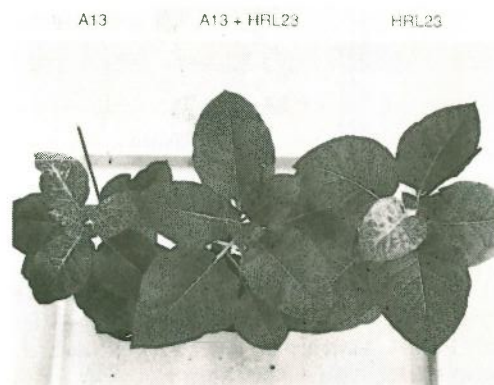


図 2 b CMV-Y 接種実験結果 (その 2)

接種 12 日目になると、典型的な CMV によるモザイク病徴が 2-5 Aase (A13), RNaseL (HRL 27) 植物に現われる。一方、2-5 Aase+RNaseL タバコでは全く病徴が出現しない。

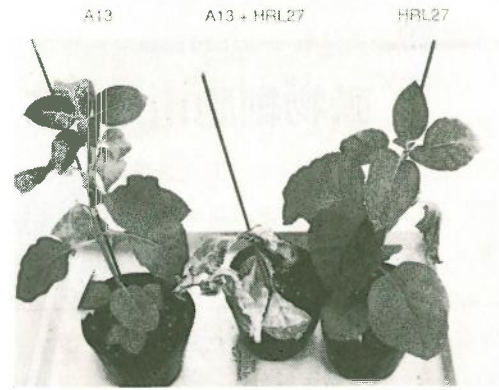


図 3 PVY-T 接種実験結果

PVY-T 接種後 14 日目の植物体。2-5 Aase+RNaseL タバコ (A13+HRL 27) は、維管束から壊死が始まり植物体が枯死する。2-5 Aase (A13), RNaseL (HRL 27) タバコでは、壊疽系統の PVY-T による典型的な壊疽を伴う感染が進行するが、植物体は枯死しない。

かった (図 2 a, b)。次に PVY-T (ポテトウイルス Y-T 株, 壊疽系統) を接種したところ、2-5Aase+RNaseL タバコにおいてのみ接種葉に壊死斑が形成されたものの、植物体は 20 日以内に枯死した。驚べきことには、PVY-T を接種した 2-5Aase+RNaseL タバコ植物体からはウイルスは検出されなかった (図 3)。また、モザイク系統の PVY-O でも全く同様な結果が観察され、この現象は PVY の株によらないことが明らかとなった。

2-5Aase+RNaseL タバコにおいて CMV-Y, PVY-T 接種で見られた接種葉での壊死斑形成は、宿主のタバコ (*Xanthi nc* 株) の N-gene が関係しているとも考えられた。そこで、N-gene を持たないタバコ (*Samsun* 株) において、2-5Aase と RNaseL の効果を検討したところ、*Xanthi nc* 株と全く同様な結果が得られた。よって、2-5A システム導入植物で見られるウイルス感染による宿主細胞の壊死は、N-gene と関係ないと考えられた。

CMV-Y 接種と PVY-T または -O 接種で見られる結果の違いは、ウイルス感染細胞内でのウイルス複製中間体である二重鎖 RNA の量の違いに起因すると考えられる。PVY-T 接種では、感染細胞内で 2-5Aase の基質となり得る二重鎖 RNA 量が少ない¹¹⁾ ために 2-5Aase の活性化が起きて感染細胞が壊死する前に、接種葉の感染細胞から少量のウイ

ルスが流出して全身に回るためと考えられる。

ウイルス感染によって宿主細胞が壊死するという現象は、動物細胞では見られない反応である。植物細胞は、ウイルスや糸状菌の成分であるエリシターによって細胞壊死(HR;過敏反応)が誘導されることが知られており、HRは細胞内の H_2O_2 量の増大が引き金になると考えられている¹²⁾。2-5Aシステム発現植物細胞中ではウイルス感染によってRNaseLが活性化され、植物細胞自身のmRNAも分解されると考えられる。その結果、 H_2O_2 分解酵素の活性が阻害され、HRが感染細胞内で誘起されると想像される。

3. おわりに

従来開発されてきた方法は、ウイルス抵抗性植物自身がウイルスを保毒するため、圃場においては他のウイルス抵抗性でない植物のウイルス源になってしまうという心配があった。この2-5Aシステムの植物への導入は、圃場においてウイルスによる被害を他へ拡散させないという意味で画期的な分子育種法となると期待される。また、この2-5Aシステムは二重鎖RNAを認識することから、多数の植物病原性ウイルスに対して有効と考えられる。

キリン社では、2-5Aシステムによる植物分子育種技術を、スプレーキク、カーネーション、マイクロチューバー事業に応用していきたいと考えている。

ごく最近、Silvermanらも私達と類似な結果をタバコエッチウイルス、アルファルファモザイクウイルス感染実験によって発表している¹³⁾。

文 献

- 1) 石田 功 (1996) バイオサイエンスとインダストリー, 54:16-21
- 2) Ishida, I., T. Ogawa, M. Yoshioka, T. Hori and T. Ohtani (1995) *Acta Horticulture*, 420:52-57
- 3) Watanabe, Y., T. Ogawa, H. Takahashi, I. Ishida, Y. Takeuchi, M. Yamamoto and Y. Okada (1995) *FEBS Letters*, 372:165-282
- 4) 石田 功・小川俊也・渡邊雄一郎・岡田吉美 (1996) 平成8年度日本生物工学会シンポジウム講演要旨, 大阪, 7月
- 5) Ogawa, T., T. Hori and I. Ishida (1996) 8th International Congress of Plant Microbe Interactions, Abstract, July Ogawa, T., T. Hori, I. Ishida (1996) *Nat. Biotech.* (in press)
- 6) 小川俊也・堀 珠希・石田 功 (1996) 平成8年度日本分子生物学会講演要旨, 北海道, 8月
- 7) Benech, P., Y. Mory, M. Revel and J. Chebath (1985) *EMBO J.*, 4:2249-2259
- 8) Zhou, A., B. A. Hassel and R. Silverman, (1993) *Cell*, 72:753-765
- 9) Wells, J.A., E. A. Swyryd and G. R. Stark (1984) *J. Biol. Chem.*, 259:1363-1370
- 10) Silverman, R. H. (1985) *Anal. Biochem.*, 144:450-460
- 11) Valverde, R. A., J. A. Dodds and J. Heick (1986) *Phytopathology*, 76:459-465
- 12) Mehdy, M. C. (1994) *Plant Path.*, 105:467-472
- 13) Mitra, A., D. W. Higgins, W. G. Langenberg, H. Nie, D. N. Sengupta, and R. Silverman (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:6780-6785

国内情報

線虫の絶対寄生細菌パストリアは実用に供せるか

(株)ネマテック

川田弘志

「環境を保全し、生産性の低下なく、持続可能な農業技術」、我々は、はたしてそれを提供することができるであろうか。経済の発展は良質な食を求め、高度な土地利用は連作障害を引き起こしている。その元凶のひとつ線虫。難防除といわれ多大の農薬と費用を要する厄介者である。しかし、線虫はその量が問題なのであって、少々いたって構わない、そこにつけ込む隙一生態系を利用する可能性一がありそうだ。

1. はじめに

急激な人口増加と経済発展は、食糧の増産と質の変化を求めている。また、食糧供給速度が人口増加速度を上回らないことが明らかになる一方で、食料の増産活動が環境の悪化をもたらしつつあることも事実である。

現在、環境を念頭においた農業生産性の向上は世界的な問題である。今まで生産性の向上に大きく貢献してきた化学肥料、農薬の環境への影響が懸念され、その効果的利用方法、代替技術の確立は世界的な課題である。いくつかのくん蒸剤は既に市場から姿を消し、臭化メチルも、オゾン層破壊の原因物質として2000年以後、農耕地への使用が制限される。

一般に、土壌病害・線虫の防除は、地上部の病害虫に比較して極めて困難であり、農耕地に投入される単位面積当たりの化学農薬の量は地上部に散布される農薬の数倍から数十倍に及んでいる。

片や、先進国においては、生産費用の増加に見合った作物と栽培体系をとらざるを得ず、高度な土地利用をはかるには収益性の高い野菜の連作、果樹栽培を避けることはできない。連作は土壌病害・線虫の蔓延をもたらし、化学農薬の大量投入は不可避である。

経済発展に伴い、肉、野菜、果樹の需要が高まることは、アジアにおける穀物需給の構造が大きく変化したことからも明らかであり、同時に、持続可能な農業を行うための技術革新が求められている。

2. 線虫制御の課題

線虫は一般穀物において慢性的な減収を引き起こし、野菜等園芸作物はもとより、ジャガイモ、マメ類での被害は顕著である。しかし、線虫の制御は困難であり、一般の病害虫に比較して被害回避に要する費用負担は大きく、農薬による線虫の防除は先進国においてすら収益性の高い作物だけに行われているのが実情である。

また、果樹等、永年作物の線虫防除は、農薬の効果持続期間を長くすれば、収穫物への農薬残留が増する、という相反する問題や、薬剤を土壌内へ均一処理することが難しい、という問題が避けられず非常に難しい。

3. パストリアの特性

パストリア (*Pasteuria*) は、世界の温帯から熱帯に普遍的に分布し、従来、線虫被害を抑制する細菌として各国で研究されてきた(写真1, 2, 図1)。それは、①線虫の産卵を強く抑制する、②特定線虫の絶対寄生細菌

KAWADA Hiroshi ●

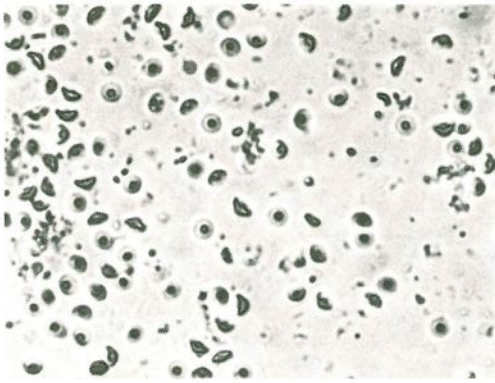


写真1 パストリア・ペネトランス



写真2 線虫に寄生したパストリア・ペネトランス

で、他の生物に対する安全性が確保できる、③芽胞を作り環境の変化、化学物質に対する耐性が強い、④効果が極めて長期に及ぶ、ことによる。

しかし、一方、①特定線虫の絶対寄生細菌であり生産性が極めて悪い、②運動能力がないため土壤中で線虫に付着させるには大量の施用が要求される、③線虫制御効果は主に産卵抑制作用であり、殺線虫能力がないため即効性が期待できない、などによって、実用化は人工培養技術の完成を待つ以外ないと判断されていた。

4. 実用化技術の開発

(株)ネマテックは植物、線虫、パストリアの特性を詳細に検討して、①連作により圃場で増殖しうるパストリア密度、および効果発現密度を見出し、②植物を使う素朴な手段でパストリアの生産性を大きく向上する方法を

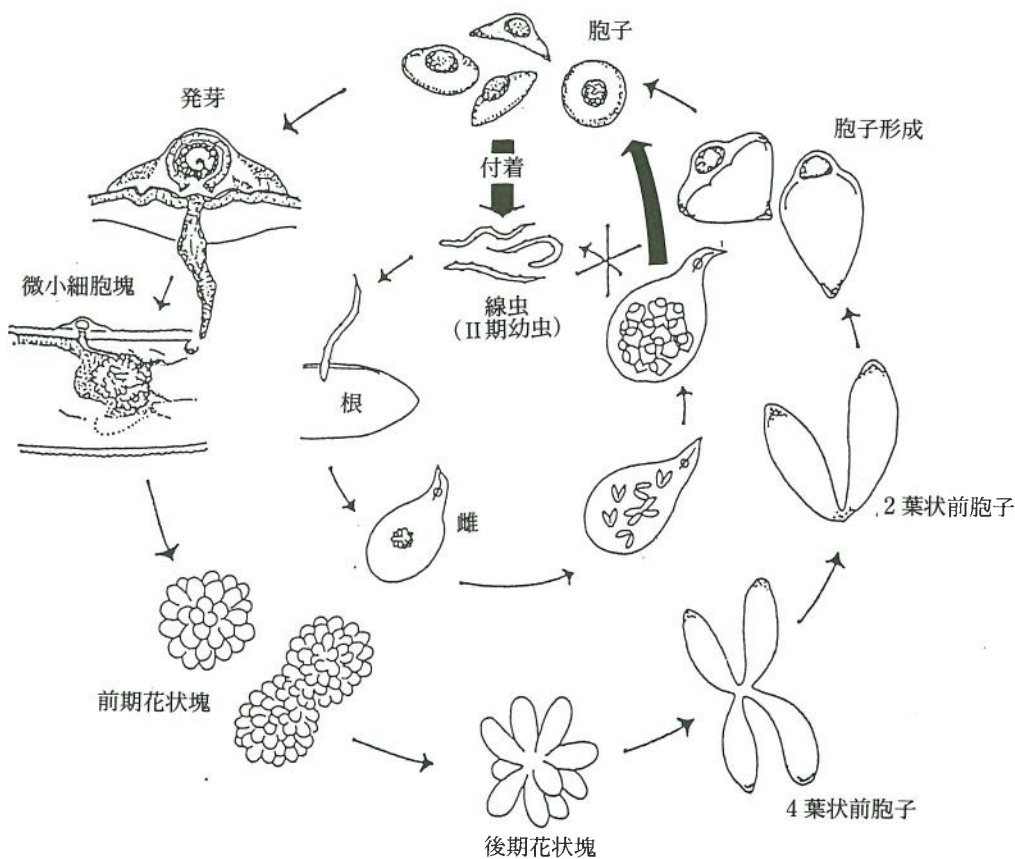


図1 パストリア・ペネトランスの生活環 (森山原図)

表 1 連作トマトに対する生育向上効果

処 理 区	1 作後 草丈 (cm)	2 作後 草丈 (cm)	3 作後 草丈 (cm)	4 作後 果実重 (g/株)	5 作後 果実重 (g/株)
<i>Pasteuria</i>	185	129	168	1,405	3,080
農 薬	196	141	149	250	1,760
無 処 理	125	155	150	225	1,210
<i>Pasteuria</i> 付 着 率 (%)	20	42	69	71	88

Pasteuria 区：1 作に *Pasteuria* 5×10^9 /m² + オキサミル 15 g/m²，5 作にホスチアゼート 10 g/m² 追加処理

農薬区：1, 3, 4 作オキサミル 30 g/m²，5 作にホスチアゼート 20 g/m² 追加処理

注) 2 作目は全区無農薬栽培で被害が拡大した。

表 2 イチジクに対する一年半後の増収効果

処 理 区	結果枝長 (cm)	収 穫 量 (g/本)	平均果重 (g/個)	糖 度
<i>Pasteuria</i> 5×10^9 /m ²	95	1,650	64	15.2
” 2×10^{10}	93	1,640	63	15.0
” 5×10^{10}	93	1,480	64	15.1
クロルピクリン	98	1,650	77	14.2
無 処 理	69	830	49	15.3

注) 新植・根域制限栽培

見い出した。さらに③水を用いる製剤と処理方法を見出し、従来の方法に比べ大幅に必要な量を削減しうる技術を確立した。また④即効性がない問題点を、殺線虫剤を併用するか、太陽熱消毒、不耕起栽培等、新規な技術で補うことによって解決した。

これらの技術により、パストリアを施用した最初の年から殺線虫剤の単独使用と比較して、むしろ優る収穫量が得られる（熊本県農業研究センター、表 1）。現在の処理量で、パストリアによる明瞭な効果が現れるには 2 年以上を必要とする。しかし、1 度の施用で効果が 5 年以上持続する（九州農業試験場）ため、殺線虫剤と併用しても費用の増加にはならない。むしろ、減農薬、無農薬、有機栽培作物として付加価値が増し農家の収益性は向上すると考えられる。また永年作物におけるパストリアの効果は、根域制限栽培のイチジクの 1 例であるが、パストリアの処理翌年で無処理区に比較して明らかに生育が優る結果が得られている（静岡県柑橘試験場落葉果樹分場、表 2）。

これまで、10か所以上の国、県の試験場でパストリアによるサツマイモネコブ線虫の被害抑制試験を行ってきた。その結果をまとめると、①パストリアを併用すれば、農薬を半分減らすことが可能になる、②パストリア施用の効果は 4 作目以後（2 夏経過後）に明瞭になり、線虫への付着率が約 50% 以上から効果が明らかになり、80% 以上になれば作物種、季節によっては農薬不要となる、③施用後の大量灌水はパストリアの線虫付着率を増加させる、④線虫密度は農薬区より低く推移する傾向を示すが、連作によって、パストリア単独で農薬に優る収穫量が得られる場合でもネコブ寄生度は農薬区より高い場合がある（茨城県農業総合センター農業研究所、写真 3）、⑤ネコブ寄生度が高い場合であっても、根張りは明らかに農薬区に優っている、⑥良好な根張りが地上部の生育、収穫量を確保している、と推定される。トマト 16 例の試験平均値は農薬区に比べ 15% 増収をもたらした。

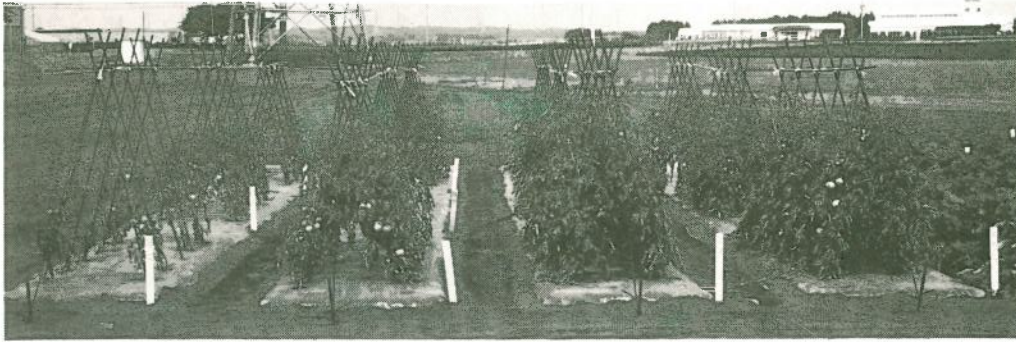


写真3 パストリア処理4年後の効果

左から無処理, ホスチアゼート30g/m², パストリア, パストリア+クロロピクリン30ml/m²

5. 事業化

効果発現が遅く、永久に効果を示し続けるものであれば、普及に時間ばかりがかかって、1度売ったら、2度と買って貰えないという、企業としては笑えない問題を抱える商品になりかねない。一方、それほどの優れたものであるならば、たとえ売りつきりであっても現在の技術、市場規模から十分事業化が可能とも言えよう。

事業化に先立つ、パイロットプラントによる検討の結果、パストリアは増殖期間が長く、植物を用いる増殖方法は土地利用型、労働集約的にならざるをえない。それでも、設備投資費用、ランニング費用の回収は十分可能であることが明らかになった。

6. おわりに

パストリアによる線虫被害の抑制技術は、従来の殺線虫剤に強く依存した線虫の制御方法を大きく改善し、有効な線虫対策を採り得なかった永年作物にも適用できるものであって、線虫を含む生態系（環境）を維持しながら作物の収穫量を確保する画期的なものである。

当社が取り扱ったパストリアはネコブ線虫用である。しかし、この線虫の抑制技術、生産技術は、他の線虫を対象とするパストリアにも、その他の微生物にも応用することは十分可能であり、世界の農業生産に少なからず影響を与えるものと考えている。

文 献

- 1) 西澤 務 (1992) 線虫研究の歩み, 日本線虫研究会, pp.267~271
- 2) Gaspard J. T. (1991) 九州農業試験場ニュース, No.48
- 3) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4, Section 33, pp.2586~2615 (1989)
- 4) 奈良部 孝・安達 宏: 特開, 平6-261791
- 5) Sayre, R. M. (1983) *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33: 636-649
- 6) Stirling, G. R. (1984) *Phytopathology*, 74: 55-60
- 7) Nisizawa, T. (1984) Proc. First Intl. Cong. Nematol., 60-61
- 8) Sharma, R.D. et al. (1991) *Nematologica*, 37: 483-484
- 9) Kasumimoto, T. et al. (1993) *Jap. J. Nematology*, 23(1): 10~18
- 10) ディーター・ノルトマイヤー, 特開, 昭62-29506
- 11) ステファン・M. ブラウンほか, 特開, 昭62-195315

国内情報

コメットアッセイ法を用いた単一初期胚のDNA損傷の検出

農林水産省 畜産試験場

高橋昌志

コメットアッセイ法は単一細胞のDNA損傷を検出できる手法である。この手法を利用して、初期胚の培養環境が胚に及ぼす環境条件のストレスとしてのDNA損傷を指標とした検出法について検討した。その結果、体外培養環境下では体内環境と比べて、胚のDNAが損傷を受けていることが明らかになった。この手法を用いることにより、胚の受けるストレスの測定が単一胚で可能になり、体外培養条件の検討、あるいは胚に対する酸化ストレスの作用機構の解明および防止技術の開発が期待できる。

1. はじめに

近年の目覚ましい体外培養技術の発展により、哺乳動物胚を体外にて培養することが可能になっている。しかし、体内発育胚に比べて体外で培養した胚はその形態、細胞数あるいは発生速度等の点において差が認められ、このことは現在使用されている培養環境が必ずしも最適であるとは言えないことを意味している。

最近、初期胚の体外培養に及ぼす酸化ストレスの影響の観点からの研究が数多く報告されている。体外培養マウス胚の細胞内過酸化水素発生量は、体内発育胚と比べて急激な増加が見られること¹⁾や培養液へのフリーラジカルスカベンジャー添加による胚発生促進効果²⁾、あるいは生体内に近い低酸素濃度培養による発生促進効果³⁾は、体外培養下における酸化ストレスと胚の発生とが深く関わっていることを示唆している。細胞内に発生した活性酸素はDNAに対して損傷を及ぼすことが知られている⁴⁾。適切な培養環境が得られない場合には、この培養環境が胚内部における還元環境のバランスを崩してしまい、それによって生じた活性酸素が胚発生にさらなる障害を及ぼすことが考えられる。このDNA

損傷を、培養環境による細胞内環境のアンバランスの指標としてとらえ、これを検出することで胚の培養条件の評価法として利用することが考えられる。そのためには胚のDNA損傷量の検出が必要であるが、検出に用いる胚の細胞数が極めて少ないので、培養細胞で用いられているDNA抽出後の検出法を利用できない。我々は、筑波大と共同で、単一細胞をそのまま用いてDNA損傷を検出するコメットアッセイ法⁵⁾を用いて、体内と体外で胚の受けるストレスの指標としての利用可能性について検討した。

2. コメットアッセイ法とは

マイクロ細胞電気泳動法 (Micro cell gel electrophoresis) と呼ばれるが、この手法によって検出される像が後ろに尾を引いた彗星のように見えることから、コメットアッセイ法とも言われている (こちらの名称の方が一般的になりつつあるようである)。この手法は放射線医学の分野で開発され、放射線の照射を受けて被爆した胸腺細胞が細胞死を起こす際に観察されるDNAの断片化を検出するための手法として現在用いられている。従来、このような細胞のDNA断片化を調べる際の手法としては、細胞を多数用い、DNAを抽出した後、電気泳動を行い、断片化したDNAの梯子状になったバンドを検出するこ

TAKAHASHI Masashi

とによって、細胞の DNA 断片化状態を観察する手法が行われていた。しかし、この手法には多数の細胞を必要とし、DNA 抽出の手間もかかるため、少数の細胞を用いたごく少量の DNA 断片化を調べようとする際には困難が伴う。

ここで紹介する comet assay は細胞をスライドガラス上でそのままアガロースゲルに包埋してしまい、ゲル内に細胞を保持したままタンパク質成分を溶解除去し、裸になった DNA を電気泳動するという手法である (図1)。この手法を用いることによって、断

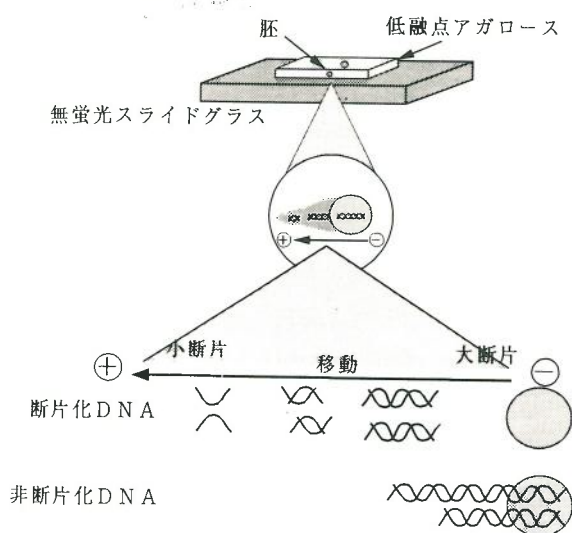


図1 コメットアッセイ法の原理

片化して小さくなった DNA はより遠くに移動し、断片化を受けなかった大断片はあまり移動せず、細胞内ないしその近辺に位置する。泳動後、断片化した DNA を検出する際には、蛍光顕微鏡を用いた方法が用いられる。これには、一般に DNA 染色に使用されているエチジウムブロマイド、アクリジンオレンジ、あるいは DAPI 等の蛍光試薬が用いられる。蛍光によって検出された断片化 DNA を解析する際には、検出像を写真撮影し、泳動像のスメア状になった尾の部分の距離を計ることによって断片化を計測するのが一般的である。しかし、泳動距離だけではなく、断片化した DNA の量的な検出を行うことも必要であり、この場合には単なる泳動距離の測定のみでは不十分である。最近では画像解析技術を用いて、断片化 DNA の蛍光強度をより詳細に解

析する手法がとられてきつつある。

3. コメットアッセイ法を用いた単一ハムスター初期胚の DNA 損傷の検出

実際に comet assay を用いて、体内発育胚と体外で培養した胚について発育環境による胚への酸化ストレスの指標としての DNA 損傷の検出を試みた結果を示す。ハムスター初期体内発育胚を 1 細胞および 2 細胞期で採取して試験に用いた。体外培養胚は、1 細胞期初期で採取した胚を培養液中で一定時間培養し、体内発育胚の採取時期と合わせた時間に相当する時期で試験に用いた。前記した手法にしたがって、胚をスライドガラス上で低融点アガロースに包埋し、アルカリ処理によるタンパク質除去後、そのまま電気泳動を行い、エチジウムブロマイドを DNA 検出試薬として使用し、染色を行った。DNA 損傷の検出は蛍光顕微鏡にて行った (図2)。最初に胚の DNA 損傷検出が可能かどうかについて調べるために、採取直後の 1 細胞期胚

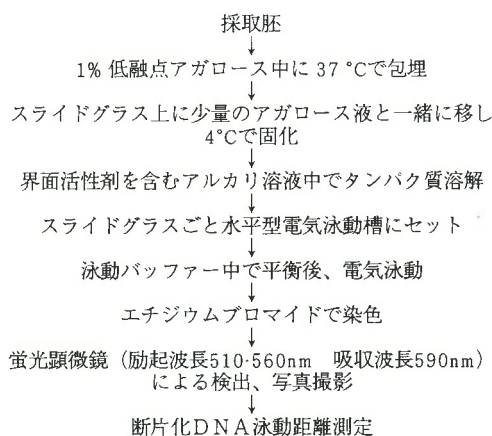


図2 コメットアッセイ法のフロー



写真1 コメットアッセイ法による胚の DNA 損傷像の右側が初期胚。左側に向かって断片化 DNA のテールが見える。

に紫外線照射および培養液中への過酸化水素添加による DNA 損傷処理を行い、コメットアッセイ法による DNA 損傷の検出を行った。その結果、DNA 損傷処理を加えた胚において、長い尾を持った彗星状の損傷 DNA 像が検出された (写真 1)。損傷 DNA の泳動距離を測定した結果、損傷 DNA の泳動距離は非損傷胚のそれよりも長かった (図 3)。

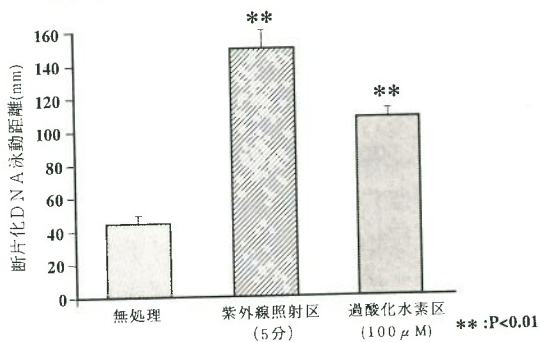


図 3 DNA 断片化処理を加えた胚の DNA 損傷

このことより、それぞれの単一胚について DNA 損傷の検出が可能であることが明らかになった。次に、体内発育および体外培養胚について断片化 DNA の泳動距離を解析した結果、1 および 2 細胞期胚共に、体外培養胚のほうが DNA の移動距離が長く、すなわち、DNA 断片化の程度が高いことが明らかになった (写真 2, 図 4)。また、この損傷量は



体内発育胚



体外培養胚

写真 2 コメットアッセイ法による体内発育及び体外培養胚における DNA 損傷

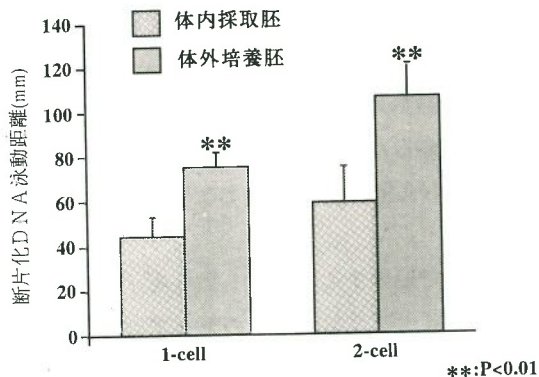


図 4 体内発育及び体外培養胚における DNA 損傷
培養時間が経過するにしたがって増加した。同時に細胞内過酸化水素の発生を検出する試薬を用いた結果、体外培養胚における過酸化水素の増加が見られ、この結果と胚の DNA 損傷の増加とが関係していることが示唆された。

4. おわりに

コメットアッセイ法は、通常 DNA を扱う際の機器をそのまま利用して行うことが可能であり、操作も非常に簡易である。しかし、手法の簡易さとは逆に、単一細胞レベルの DNA 断片化を検出することができる非常に感度の高い手法でもある。現在、この手法を解析に利用した、細胞におけるアポトーシスや酸化ストレスに関する研究が行われている。この手法を用いることにより、胚の受けるストレスの測定が可能になり、体外培養条件の検討、あるいは胚に対する酸化ストレスの作用機構の解明および防止技術の開発が期待できる。

文 献

- 1) Nasr-Esfahani, M. H. *et al.* (1990) *Development*, 109 : 501-507
- 2) Noda, Y. *et al.* (1991) *Mol. Reprod. Dev.* 28 : 356-360
- 3) Li, J. and R. H. Foot (1993) *J. Reprod. Fert.* 98 : 163-167
- 4) Rongliang, Z. (1988) *Scientia Sinica*. 6 : 676-686
- 5) Singh, N. P. *et al.* (1988) *Exp. Cell. Res.* 175 : 184-191

国内情報

2種酵素共存反応系によるL-アスパラギン酸製造法

三菱化学株式会社 筑波研究所
後藤 誠・寺沢真人・湯川英明

L-アスパラギン酸は、環境適応型素材として世界的に注目され、大きな市場が期待されている。著者らは、マレイン酸を原料としたL-アスパラギン酸の新規な製造法を確立した。この製造法のポイントは、マレイン酸異性化酵素とアスパルターゼの2種の酵素共存反応系による one-pot 反応を確立したことにある。

1. はじめに

酵素反応を利用した工業化プロセスは、グルコースイソメラーゼによる異性化糖の製造¹⁾、アミノアシラーゼによるL-アミノ酸製造²⁾等の例に見られるように、ほとんどが1種の酵素を利用した反応である。複数種の酵素を利用したプロセスとしては、L-アラニン製造法(2種の酵素を用いた2段階反応)³⁾が報告されているが、小規模な生産設備とのことである。

我々は、複数酵素で年産数万トン以上の生産が可能な大規模生産プロセスの確立を目標とし、研究開発を行っている。本稿では、我々のプロセスの一例として、L-アスパラギン酸製造への応用を紹介したい。

2. アスパラギン酸生成酵素

マレイン酸原料からのL-アスパラギン酸製造には、マレイン酸とフマル酸の間の異性

化反応を可逆的に触媒するマレイン酸異性化酵素(EC 5.2.1.1)⁴⁾と、フマル酸へのアンモニア付加反応を可逆的に触媒するアスパルターゼ(EC 4.3.1.1)⁵⁾の2種の酵素活性を利用した(図1)。

マレイン酸異性化酵素は、正式名はマレイン酸 *cis-trans* イソメラーゼといい、二重結合を介したマレイン酸の異性化を触媒する酵素である。本イソメラーゼ以外にも異性化酵素は、糖類や有機酸等の異性化反応を担う各種の酵素が応用的にも注目され、例えば、ぶどう糖からの果糖生成を触媒するグルコース異性化酵素のように、反応時の両異性体の存在量がほぼ等モルとなる場合が多い。しかしながら、マレイン酸異性化酵素の場合は、平衡はマレイン酸からフマル酸の生成に大きく偏っており、平衡点は、マレイン酸0.2モル%に対しフマル酸99.8モル%である(図2)。このことは、第1段目の反応工程で、マレイン酸はほぼ全量第2段目の反応工程の基質であるフマル酸に変換されることを意味し、非常に好ましい性質である。

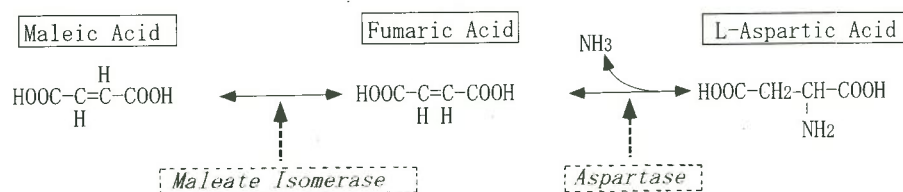


図1 アスパラギン酸生成反応

GOTOH Makoto, TERASAWA Makoto,
YUKAWA Hideaki

アスパルターゼの反応平衡は、アンモニア存在下のアルカリ条件(pH 9)では、フマル酸からアスパラギン酸への変換率は99モル%

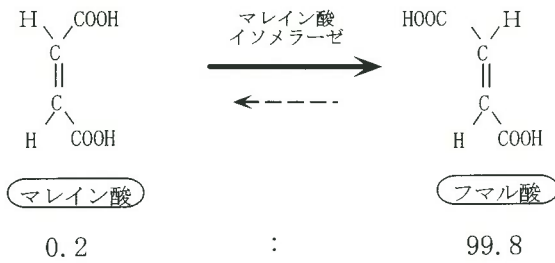


図2 反応平衡

以上となることから、両酵素によるトータル収率はほぼ等モル反応に近い。

3. アスパラギン酸生成反応条件

複数の酵素反応を one-pot にて共存反応させる場合、当然のことながら個々の酵素の

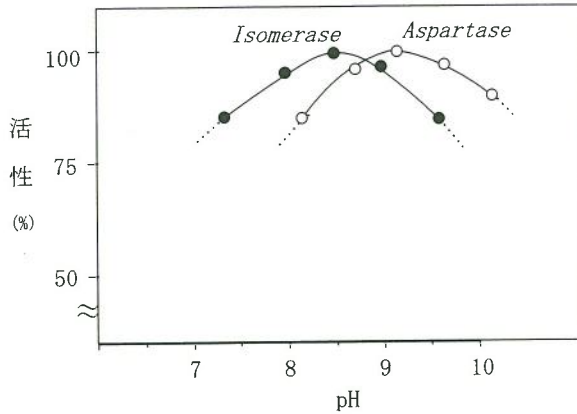


図3 アスパルターゼ及びイソメラーゼの pH 特性

反応条件の最大公約的条件が存在することが必要である。マレイン酸異性化酵素とアスパルターゼの反応条件を検討したところ、幸いにも両酵素の最大公約的条件が、個々の酵素の至適条件と大きく異なることなく効率的に生成可能であることが判明した。重要な反応条件の1つである pH 特性を例として示す(図3)。

4. 遺伝子組換えによる生産性の飛躍的向上

バイオケミカルズの工業的生産には、微生物内において目的酵素を著量生産することが重要となる。我々は、既にコリネ型細菌の *Brevibacterium flavum* MJ-233 菌のホスト-ベクター系を確立している。L-アスパラギン酸生産には、マレイン酸異性化酵素およびアスパルターゼを、*B. flavum* MJ-233 菌体内にそれぞれ著量生成させた菌を用いた(図4)。

5. Natural-immobilization プロセス

我々の製造プロセスにおいて最大の工業的特徴を実は未だ説明していない。その特徴とは、酵素反応の工業的利用で必須となる人為

Wild strain :

Recombinant cells :

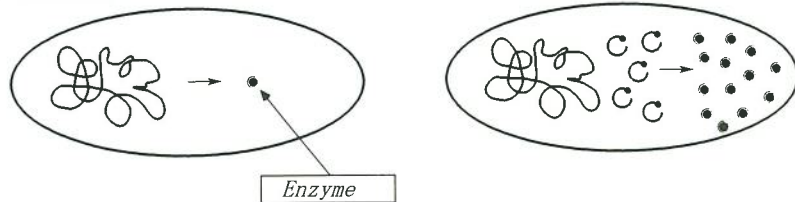


図4 目的酵素の菌体内著量生産

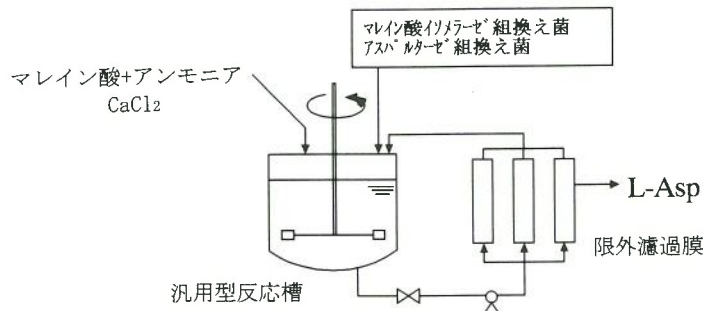


図5 アスパラギン酸製造プロセス

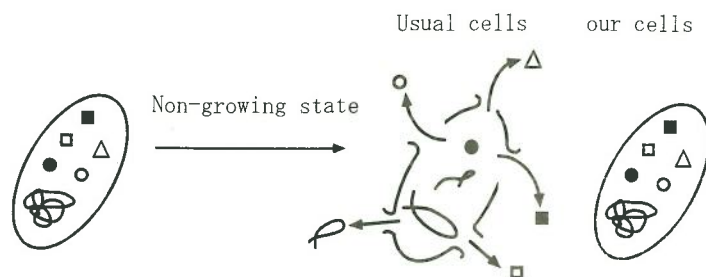


図6 溶菌現象

的な酵素固定化を必要としない点にある(図5)。すなわち、我々のプロセスは、菌体を固定化等の人為的な処理を施すことなくそのまま用い、限外ろ過膜を用いて分離した菌体を繰り返し利用することを特徴としている。

固定化法は、酵素の保持性を高め安定性を向上させる方法として有効であるが、反面、固定化処理時に酵素活性の低下が避けられないこと、固定化材における、原料、生成物の透過濃度勾配を生じ反応効率が低下すること、酵素固定化のための煩雑な工程が必要等の問題点を有していた。

われわれは、*B. flavum* MJ-233 菌の微生物学的諸性質解析の過程で、本菌が過酷な非増殖条件下でも溶菌現象を示さない性質を有していることを見出した(図6)。このことは酵素触媒としての利用に際し、固定化等の処理を施すことなく菌体内酵素活性を長時間安定に維持が可能であり、いわば natural-immobilization としての菌体の使用を可能とした⁶⁻¹⁵⁾。さらに、菌体リサイクルには限外ろ過膜を用いて、菌体への物理的損傷を抑え、製品中へのタンパク質、核酸等の菌体内構成成分体の混入を防止することにより高度の製品純度を達成することが可能となった。

6. おわりに

われわれは、溶菌しない性質を有する微生物菌体を利用した新規な膜型リアクタープロセスの適用例の1つとして、マレイン酸からの one-pot 反応による L-アスパラギン酸生

産を検討した。本例は、シンプルな装置で効率よく目的の生産物を生成可能であることを実証したものであり、L-アスパラギン酸以外にも様々な物質生産に応用できる汎用タイプのプロセスと考えられる。

文 献

- 1) Taguchi, H. *et al.* (1975) *Immobilized Enzyme Technology*, ed. by H.M. Weetall, S. Suzuki, New York, p.151
- 2) Tosa, T. *et al.* (1969) *Agric. Biol. Chem.*, 33 : 1047
- 3) Chibata, I. *et al.* (1984) *Microbiological Sciences*, 1 : 58
- 4) Behrman, E. J. and R. Y. Stanier (1957) *J. Biol. Chem.*, 228 : 923
- 5) 住木諭介 (1928) 醸協, 23 : 33
- 6) 湯川英明ら (1985) 日本農芸化学会誌, 59 : 31
- 7) 湯川英明ら (1985) 日本農芸化学会誌, 59 : 279
- 8) 湯川英明ら (1987) 日本農芸化学会誌, 61 : 1279
- 9) Yukawa, H. *et al.* (1985) *Process Biochem.* 20 : 124
- 10) 湯川英明ら (1994) 化学工学, 58 : 878
- 11) 湯川英明ら (1992) バイオサイエンスとインダストリー, 50 : 213
- 12) Yukawa, H. *et al.* (1986) *Process Biochem.* 21 : 164
- 13) Yukawa, H. *et al.* (1989) *Process Biochem.* 24 : 60
- 14) Yukawa, H. *et al.* (1990) *J. Ind. Microbiol.* 5 : 289
- 15) Yukawa, H. *et al.* (1990) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35 : 348

キノガサタケの栽培

栃木県林業センター

武田夕香

市場にはない、新しい野生きのこの収集と栽培化に取り組むなかで、国内では珍しいキノガサタケについて、自然の発生状況を調査し、菌の収集を行ってきた。キノガサタケは、現在、中国で竹林などを利用した栽培が行われているが、栃木県内においても栽培化の要望がある。そこで、収集したキノガサタケを使用して、菌の性質や子実体の発生条件などの検討を行った。

1. はじめに

キノガサタケ (*Dictyophora indusiata*) は、腹菌類に分類され、スッポンタケ科 (Phallaceae) に属する。主に熱帯を中心として、日本、中国、北アメリカ、オーストラリアなどに分布する。日本では、初夏から秋にかけて、竹林などに発生し、その特徴的な形態が話題を呼んで、時折、新聞等に掲載される。キノガサタケは原基が地上に形成されてから、3か月程で直径5 cm くらいの白い卵型の幼菌に成長し、適度な温度と湿度があるときに、卵の頂点を突き破って子実体が発生する。その後、徐々に頭部のグレバが臭いを出して溶けだし、この臭いで虫を集め、グレバに含まれる胞子を運んでもらう (図1)。白いドレスを着飾った姿は、きのこの女王といわれ、中華料理の高級食材として利用されている。

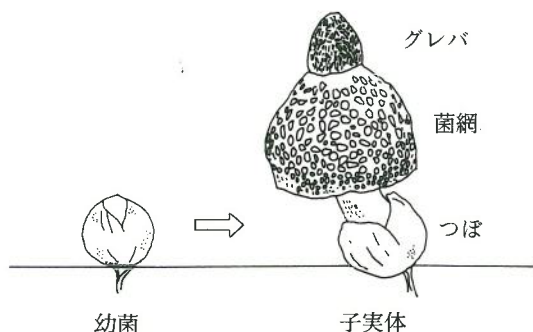


図1 キノガサタケの発生過程

TAKEDA Yuka

調理するときは、グレバとつぼを取り除き、中華風のスープに入れる。中国では、竹荪 (ツースン) と呼び、乾燥した子実体を食用にして、シャリシャリとした独特の菌触りを楽しむ。

キノガサタケは、コレステロールを減らし、脂肪を少なくするなど、中国では薬効のあるキノコとして知られている。また最近、抗腫瘍作用²⁾ などがあると報告される。

現在、中国では竹林等を利用したキノガサタケの栽培が行われている。県内においても栽培化の要望があるため、発生状況を調査するとともに、収集した菌株を用いて、菌の性質や子実体の発生条件等の検討を行った。

2. キノガサタケの発生状況

1993年7月下旬～8月上旬にキノガサタケが発生した栃木県日光市野口、日光市久次郎、塩原町宇都野の3か所の調査地について発生状況を調べた。野口調査地は、元河川敷であり、放置された梅園の中で、ヨシが生育している。久次郎調査地は、ツツジ等が植えられた庭地で、クリの木の下にホテイチクが生育している。宇都野調査地は、モウソウチク林近くの空き地である。キノガサタケは、地中の枯れた根に菌糸を成長させ、菌糸束を地上に伸ばして、幼菌をつくる。各調査地では、ヨシやホテイチク、モウソウチクの枯れた根から菌糸束が伸びて、子実体を発生させてい

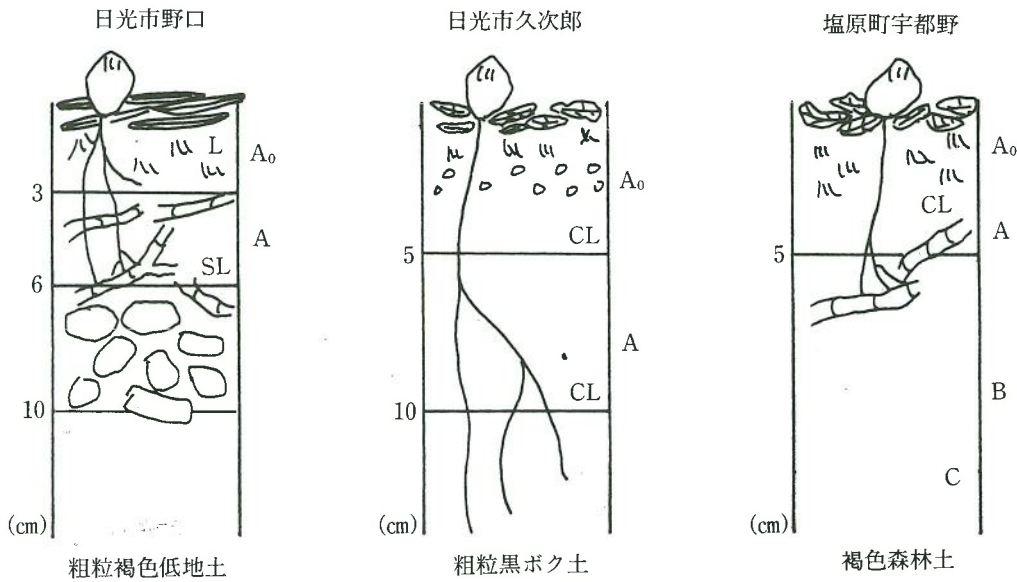


図2 各調査地の土壌断面図

A₀層：落葉層
 A層：腐食が混入した鈣質土壌
 B層：有機質の少ない
 L：壤土
 SL：砂壤土
 C：植土
 CL：植壤土

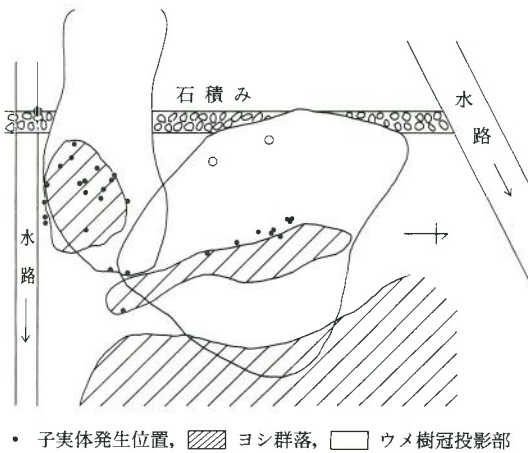


図3 キヌガサタケの子実体発生位置

ることがわかった(図2)。

また、キヌガサタケの発生数が多かった野口調査地では、適度な温度と湿度があるウメノキの樹冠下で、ヨシの生育地に沿って発生

していることが確認された(図3)。

3. キヌガサタケの性質

1992年9月、塩原町宇都野で発生したキヌガサタケの幼菌を採集し、PDA(ぶどう糖加用ジャガイモ煎汁寒天)培地上に組織培養して保存し、培養温度と培地基材に対する菌糸の伸長量を測定した。菌糸の伸長可能な温度範囲は8~30°Cで、最適温度は24°Cであった。培地基材については表1の材料を使用して菌糸伸長量を測定した結果、各培地に鹿沼土を加えると良好に伸長する結果となった。

表1 培地組成と菌糸の伸長

培地	材料(重量比)				菌糸伸長量 (cm)
	オガクズ	タケ	フスマ	鹿沼土	
A	10	—	2	—	8.9
B	—	10	2	—	6.7
C	3	7	2	—	8.7
D	10	—	2	10	10.9
E	—	10	2	10	11.4
F	3	7	2	10	11.7

4. キヌガサタケの栽培

国内でも自然環境を利用した栽培が実験的に行われた³⁾。しかし、キヌガサタケは初夏から秋に発生するだけなので、空調施設等を利用した栽培方法を探る必要があり、収集し



写真1 空調施設内で発生したキヌガサタケ



写真2 野外で発生したキヌガサタケ

た1菌株を使用して空調施設内と野外において子実体発生の試験を行った。

オガクズに重量比で20%のフスマを加えた培地を調製し、空調施設内発生用として栽培ビンに250gずつ、野外発生用として栽培袋に1kgずつ詰め殺菌した。その後、キヌガサタケの種菌を接種して、温度22°C、湿度70%で約1年間培養した。培養終了後、空調施設内では培地表面に桐生砂をかぶせ、温度20°C、湿度95%以上の環境で子実体の発生を促した。1か月後くらいから幼菌がではじめ、約3か月後に子実体が発生した(写真1)。固く、しっかりとした子実体であったが、菌網の孔が少なかった。また、野外では桐生砂やタケオガクズの入ったプランターに培地を埋め込み、林業センターの竹林内に置いて、1994年7月から自然条件下で子実体の発生を促した。8月に幼菌がではじめ、10月に子実体が発生した(写真2)。しかし、空調施設内にくらべ発生時の温度や湿度の変化が大きいため、子実体の傷みが早かった。

5. おわりに

今後は、培養期間の短縮や子実体の発生方法についてより細かい検討を行っていく必要がある。また、野生のキヌガサタケは発生地域によって、臭いの多少や菌糸伸長の遅速等があるため、栽培に適した市場性のある系統を選抜して、特産物としての可能性を検討する予定である。さらに、キヌガサタケは中華料理以外の調理方法も考えられ、21世紀の食材として夢をふくらませる、楽しみなきのである。

文 献

- 1) 今関六也・本郷次雄編(1989)原色日本新菌類図鑑(II), p.222, 保育社
- 2) 水野卓・川合正允(1995)キノコの科学・生化学, 279-283, 学会出版センター
- 3) 岩出亥之助(1985)キノコ類の培養法, 292-296, 地球社

文献情報

マルトースの新しい製造法への挑戦
—生デンプンを分解する新規
β-アミラーゼの精製—

デンプンを加水分解する酵素はアミラーゼと呼ばれており、大別するとα-アミラーゼとβ-アミラーゼの2種類に分けられる。α-アミラーゼは主に唾液、膵液に含まれ、デンプン分子の内部よりα-1,4-グリコシド結合を加水分解（エンド型）しながらデキストリンを生成する。一方、β-アミラーゼはデンプン分子の末端より（エキソ型）、順次にマルトースを遊離しながら分解していく。

アミラーゼに関する研究は古くから行われており、なかでもβ-アミラーゼは食品・飲料業界において大きな商業価値を持っていることから注目されている。例えば、最近話題の低カロリー甘味料であるマルチトールは、デンプンにβ-アミラーゼとイソアミラーゼを同時に作用させてマルトースを製造し、それを還元したものである。

β-アミラーゼは、トウモロコシ、サツマイモ、ダイズ、コムギ、オオムギ等の高等植物や、*Bacillus* 属や *Clostridium* 属等の微生物によって生産される。しかしながら、植物および微生物由来のβ-アミラーゼで生デンプンを直接分解させたという報告はない。

生デンプンはアミロペクチンやアミロース分子相互が強い結合力によって、規則正しく集まったミセル構造からできている。そのため、酵素分解を行うのが非常に困難である。そこで従来より、β-アミラーゼの加水分解活性を増大させるために、生デンプンをα-デンプンにする等の前処理が必要とされている。生デンプンに水を加えて加熱していくと、デンプン粒の一部が崩れてすき間ができ、水が侵入して膨潤し始める。ミセル構造が崩れて生じた、このようなデンプンはα-デンプンと呼ばれ、酵素の接触する面が広く分解されやすくなっている。

Sohn ら (J. Microbiol. Biotechnol (Seoul). 2: 183-188, 189-196 (1992)) は土

壌中から、生デンプンを直接分解する糖化活性の高いβ-アミラーゼ生産菌をスクリーニングし、*Bacillus polymyxa* No.26-1と同一とした。また、その菌が可溶性デンプンと生デンプンを糖化する2種類のβ-アミラーゼを菌体外に生産することを明らかにした。ここでは、彼らが生デンプンに対して分解活性が高いβ-アミラーゼを *B. polymyxa* No.26-1の培養液から分離し、その酵素の特徴および分解様式を明らかにした論文を紹介したい。

培養4日後、*B. polymyxa* No.26-1からβ-アミラーゼの最大活性が得られた。精製された酵素は単量体であり、分子量はSDS-PAGEより53kDa、セファデックスG-100を用いたゲル濾過より56kDaであることが確認された。等電点は9.1であった。

酵素活性における温度の影響を調べたところ、至適温度は45°Cであり、40°C以下では酵素は安定していた。また、55°C、30分間の加熱処理においても、初期の酵素活性の40%以上の活性が保持されていたことから、熱に対して比較的耐性を持った酵素であることが示唆された。酵素活性における至適pHは5.5であった。pHは5.0から8.5の間で安定しており、それより酸性側あるいはアルカリ側では著しく活性が低下した。

本酵素は生デンプンを分解する際に、デンプン粒に強く吸着して分解するという特徴がみられた。生デンプンが分解される様子を走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ、分解初期にデンプン粒に3~5個の穴が開いているのが見られた。穴は次第に大きくなり、6日以内に生デンプンは完全に可溶化された。そこで、精製した酵素が、トウモロコシデンプンに吸着する際のpHの影響を調べたところ、中性付近での吸着率が高いことが確認された。吸着に対する温度の影響はほとんどみられなかった。酵素添加後、5分以内に85%以上がデンプンに吸着し、1%濃度のマルトースを加えることにより、容易にデンプンから遊離した。

本酵素によるデンプンの分解様式を薄層クロマトグラフィーによって分析したところ、

分解最終生成物はマルトースであった。酵素分解によりマルトテトラオースやマルトヘキサオースが検出されないことから、本酵素はエキソ型の β -アミラーゼであることが明らかになった。

一方、本酵素は、プルラナーゼを加えることで加水分解活性が促進した。特に、プルラナーゼと本酵素の混合比が1:4の時に最も分解活性が高かった。植物や他の微生物が生産する β -アミラーゼと比較し、本酵素の加水分解活性はプルラナーゼの存在下で、より促進されることが認められた。

B. polymyxa No.26-1由来の β -アミラーゼは、生デンプンを容易に直接分解することができ、その分解がプルラナーゼを共存させることにより著しく促進されるという点で興味深い。今後、この酵素について詳細な検討が行われ、酵素の固定化等により分解活性を効率的に増大させるシステムが構築できれば、生デンプンからマルトースを商業規模で生産することが期待される。

(抄訳 山本 英司—マルハ(株)中研)

(YAMAMOTO Eiji)

Purification and characterization of β -amylase from *Bacillus polymyxa* No.26-1

Sohn, C. B., Lee, S. M., Kim, M. H., Ko, J. H., Kim, K. S., Chang, J. E., Ahn, Y. K., and Kim, C. H.

J. Food Sci., 61(1): 230-234, 1996

文献情報

受精時にはたらく精子内のタンパク質

受精において、細胞内カルシウムイオン(Ca^{2+})は重要な役割を果たしている。受精卵の細胞内 Ca^{2+} は劇的に上昇し、卵表層顆粒の開口分泌を誘発し、分泌物が卵表層の構造に作用して次の精子の侵入を阻止する。受精卵の Ca^{2+} 増加は、精子付着部位から発生して細胞全体に伝播する、 Ca^{2+} ウェーブを形成する。哺乳動物の受精卵では Ca^{2+} ウェーブの後、 Ca^{2+} オシレーションと呼ばれる

一過性の Ca^{2+} 増加反応の繰り返しがおこる。しかしながら、精子のどのような物質が、どのようなシグナル伝達で Ca^{2+} 増加にいたるのかは解明されていない。ハムスターの精子抽出物を卵内に注入すると、受精時に類似した Ca^{2+} オシレーションが起きることが報告されていたが、実際の卵活性化因子は同定されていなかった。

Parringtonらは、ハムスターの精子抽出物より Ca^{2+} オシレーションを誘導するタンパク質(oscillogen)を同定した。彼らはまず33kDaと29kDaの2つのタンパク質を分離した。33kDaタンパク質はoscillogen活性があるが、29kDaタンパク質にはなかった。2つのタンパク質のモノクローナル抗体を作成し、免疫組織化学的に検出したところ、33kDaタンパク質の抗体ではハムスター精子頭部の赤道部に強い反応がみられたが、29kDaタンパク質の抗体は精子先体に反応した。この検出には固定と透過処理が必要であったことから、33kDaタンパク質は精子内に存在する可溶性のタンパク質であることがわかる。ハムスターの脳、肝臓、精子をこの33kDaタンパク質抗体で検出すると精子のみで反応し、脳と肝臓では反応がみられなかった。この結果は、脳と肝臓の抽出物を卵内にマイクロインジェクションしてもoscillogen活性が現われないという以前の報告と一致する。また、Gタンパク質活性が Ca^{2+} オシレーションを誘導すると報告されているが、このタンパク質はそれらとは異なっていた。cDNAによる解析の結果、この33kDaタンパク質は289のアミノ酸からなる分子量32,610、pIは6.4であり、*E. coli*のglucosamine-6-phosphate isomeraseに類似していた。さらに、ハムスター33kDa精子タンパク質の抗体で、ヒト、ウシの精子を免疫組織化学的に検出するとハムスターと同様に精子頭部の赤道部に強い反応がみられた。彼らはこのタンパク質をoscillinと名付け、精子と卵子の融合後に卵内にoscillinが導入されることで、細胞質内に Ca^{2+} オシレーションが起こり、卵が活性化されると説明

している。また、精子に存在する *oscillogen*, すなわち *oscillin* が哺乳類発生の生理的なトリガーであろうと述べている。

この研究では、 Ca^{2+} オシレーションに関わるシグナル伝達の一部がより詳細にされた。精子細胞内の卵活性化因子の同定により、卵活性化と Ca^{2+} 増加の関係などの受精のメカニズムがより明らかになるだろう。受精現象の解明は基礎研究のみならず、クローン動物の作出や初期発生の分野で重要な単為発生の研究、精子の卵細胞質内注入といった産業や医療の面でも有用な知見を提供するであろう。

抄訳 松本浩道—東北大農
(MATSUMOTO Hiromichi)

Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein

Parrington, J., Swann, K., Shevchenko, V. I., Sesay, A. K., Lai, F. A.
Nature, 379 : 364-368, 25 January, 1996

文献情報

異種グルコアミラーゼを生産する新規パン酵母の育種

近年、パンの品質は目覚ましく向上し、様々なタイプの製品が販売されている。特に口当たりの良い柔らかな食感のものは消費者ニーズに合致して好まれているようである。そのようなパンの食感や香りなどの特性は長い歴史の中で生地作りを中心として改善されてきた。近年では、 α -アミラーゼ、プロテアーゼ、フィターゼ、グルコアミラーゼ、キシラナーゼなどの酵素添加法が試みられている。このうちグルコアミラーゼは生地の中のデンプンを分解し、生じたグルコースをパン酵母が利用して二酸化炭素の発生が強化されることで、食感の柔らかいパンが製造できるのである。今回、筆者らはいくつかの醸造用酵母によるパン試作を行い、香りの良かったワイン醸造用の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* OC-2 株を選び出したが、ふっくらした食感を付加するためにこの株に *Aspergillus oryzae* 由来のグルコアミラーゼ遺伝子を

導入することで風味・食感の改良を試みた。

醸造用酵母は多くの場合、適当な遺伝学的マーカーとなりうるような栄養要求性を持たない。筆者らは栄養要求性マーカーをワイン酵母 OC-2 株に付与することから始めなければならなかった。そのために、既知の遺伝子 *TRP 1* 内の配列を一部欠損させたベクターで形質転換することで遺伝子破壊を行い、トリプトファン要求性になった OC-2T 株を作製し、以降の遺伝子組換えの親株とした。

一方、酵母における異種遺伝子の発現に何種類ものベクターシステムが用いられているが、筆者らは $2\mu\text{m}$ プラスミド由来の YEp 型ベクターと染色体組込み型のプラスミド YIp 型ベクターを用いて前述の OC-2T 株にグルコアミラーゼ遺伝子の導入を試みたが、前者は非選択圧条件下での継代安定性が低く、後者は安定性は高かったもののグルコアミラーゼの活性発現量が十分ではなかった。そのため、筆者らは酵母ゲノム中に存在する δ -配列を利用した組込みシステムを利用した。 δ -配列とはレトロトランスポゾンである Ty エlement が転移した後に残される約 340 塩基対の繰り返し配列で、酵母ゲノム中に約 200 コピーが存在すると考えられている。この δ -配列とグルコアミラーゼ遺伝子と遺伝的マーカーを結合したベクターにより、グルコアミラーゼ遺伝子を δ -配列の相同的組換えによって OC-2T 株の染色体内に組込んで安定に維持させることに成功した。この時のグルコアミラーゼ活性の発現量は、組込み型ベクターを用いた場合より約 7 倍の高活性を示した。さらに染色体内に組込まれたグルコアミラーゼ遺伝子は、非選択条件下で 20 世代にわたって安定的にその形質を保持することが確認された。工業的利用を考えた場合、栄養要求性などの選択圧をかけ続けることは困難であるため、この事は非常に大きなメリットとなりうる。

このように、形質転換によりグルコアミラーゼ活性を獲得した OC-2T 株は孢子形成を行わせ、生じた孢子は四分子分析にかけられた。それぞれの孢子のグルコアミラーゼ活性

はメンデルの法則に従って2:2に分離した。このグルコアミラーゼ遺伝子をもつ孢子同士を掛け合わせることで、そのグルコアミラーゼ遺伝子のコピー数は倍増することが期待されるが、好都合なことにOC-2株はホモタリックな生活史をもつため、子嚢から出芽する娘細胞は自分の遺伝子を複製することで二倍体になっている。つまり、グルコアミラーゼ遺伝子を組込んだOC-2T株を孢子形成させ出芽させた場合、約半数はグルコアミラーゼ遺伝子のコピー数が元株の約2倍に増幅していることが期待される。実際、この操作の後、グルコアミラーゼ活性を持つ株を分離し、そのグルコアミラーゼ遺伝子のコピー数を比較すると大幅に増幅しており、同時にグルコアミラーゼ活性も増加していることが示された。さて、こうして得られた強力なグルコアミラーゼ活性をもつ株は可溶化デンプンを炭素源とする培地で良好な発酵能を示し、パンの膨らみ具合に大きく影響する二酸化炭素生成量も親株の4倍以上を示した。この育種した酵母を用いてパンを試験的に作製してみたところ、常用しているパン酵母の場合より柔らかく、「溶けるような食感」であったという。

これまでの発酵工業における微生物の育種というと、薬剤や紫外線などによる変異処理と手間のかかるスクリーニングを必要としていた。しかし本論文に見られるような目的を絞った育種であれば分子遺伝学的手法により達成することが可能である。今のところ、このような異種遺伝子を導入した組換え生物の食品への利用は法的に認可されていないが、将来解禁された時をめざして研究所レベルでの試験は始まっているのである。

(抄訳 篠田 直一(カルピス食品)
(SHINODA Tadashi))

Breeding of a new type of baker's yeast by d-integration for overproduction of glucoamylase using a homothallic yeast

Saito, S., Y. Mieno, T. Nagashima, C. Kumagai and K. Kitamoto

J. Ferment. Bioeng., 81: 98-103 (1996)

文献情報

アグロバクテリウムの T-DNA 転移と線毛形成

Agrobacterium tumefaciens は、感染に際して菌体内に保持する T-DNA と呼ばれるプラスミドの一部を植物の核ゲノム中に組み込むことができる。この性質を利用することで、有用な遺伝子やその機能が明らかになっていない遺伝子を様々な植物に組み込むこと、すなわち植物の形質転換が一般的になっている。しかし、その利用頻度が極めて高いにもかかわらず、形質転換のメカニズムにはまだ不明の点が多く残されている。

T-DNA の転移には、*A. tumefaciens* の持つ Ti プラスミドの *vir* 領域が関与している。*vir* 領域には少なくとも10のオペロン (*virA* から *virJ*) が存在しており、それぞれの発現は VirA, VirG の2つのタンパク質に制御されている。T-DNA は5'末端に VirD2 タンパク質が結合した1本鎖DNAの形で植物細胞中に移行する。また VirE2 タンパク質も T-DNA を保護するような形で、または T-DNA とは別に植物細胞に移行する。これらの移行には、さらに少なくとも12種類のタンパク質 (VirB1 から VirB11 および VirD4) が必要とされるが、これらのタンパク質はヒトの病原体である *Bordetella pertussis* や *Helicobacter pylori* の性線毛の形成や毒素の放出に関わるタンパク質との関連が指摘されていた。

Fullner らは、VirB1-VirB11 タンパク質や VirD4 タンパク質が、接合時に機能する線毛のような、膜に結合した複合体に会合するのではないかと考えた。そのような構造は低温で機能することが多いことから、*A. tumefaciens* を19°Cの低温で、かつ *vir* 遺伝子群の発現が誘導されるように培地中にアセトシリングンを添加して培養し、線毛が形成されるかどうかを電子顕微鏡で観察した。野生株の A 348 は、鞭毛とは明らかに太さの異なる直径 3.8nm の線毛を形成したが、Ti

プラスミドを持たない A 136 では認められなかった。線毛の形成は、培地中にアセトシリンゴンを添加した場合にのみ認められたことから、*vir* 遺伝子群の存在が必須と考えられた。

線毛と T-DNA の転移との関係を明らかにするために、T-DNA の転移能を欠く変異体を用いて実験を行った。*virB* オペロンや *virD4* 遺伝子中に挿入変異を持つ変異体は線毛を形成することができず、また *virB* や *virD4* の発現に必要な *virA* や *virG* に変異を持つ場合にも線毛は形成されなかった。*virA*, *virG*, *virB1* から *virB11* および *virD4* 以外の線毛形成に関与する因子を明らかにするために、*virB* と *virD4* を *virA* および *virG* を持つ IncP ベクターにクローニング (pKJF 108) し、*virA*, *virG*, *virB*, *virD4* に変異を持つ *A. tumefaciens* に対して相補試験を行った。その結果、pKJF 108 を持つ菌は線毛を形成し、T-DNA や VirE2 タンパク質を他の菌や植物に転移させる能力を回復したことが明らかとなり、*virB* オペロン、*virD4* とその発現に必須の *virA*, *virG* が線毛形成と T-DNA, VirE2 タンパク質の転移に必要な因子として同定された。

A. tumefaciens の持つ線毛は接合プラスミドの厚みのある堅い性線毛とは形態的に明

らかに異なっている。これらの性線毛のタンパク質の中には、*A. tumefaciens* の VirB や VirD4 タンパク質と相同性のあるものがあるが、各々の VirB タンパク質の機能については、まだ明らかになっていない。VirB2 と VirB5 は、大腸菌の F プラスミドの pilin 等と相同性が認められることから、線毛の構造タンパク質と予想されている。また VirD4 は、IncP 系でのホモログである TraG が P 線毛の合成には必須でないことを考えると、その機能に興味を持たれる。

線毛は T-DNA の転移にどのように機能しているのだろうか？ 筆者らは、おそらく F プラスミドにコードされる性線毛のように、相手となる細胞を探し当てるのに機能しているのではないかと想像している。相手を探し終えたあと、線毛は T-DNA と VirE2 タンパク質を直接植物細胞に導入するチャンネルを作るのであろう。この過程がより詳細に解明され、T-DNA 転移の全容が解明されることが期待される。

(抄訳 柄澤 明—東北大農)

(KARASAWA Akira)

Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes

Fullner, K. J., J. C. Lara and E. W. Nester
Science, 273 : 1107 (1996)

海外便り

中鎖脂肪酸の有する腸管吸収促進機構の解明

—スウェーデン ウプサラ大学での1年—

京都大学 農学部食品工学科

木村幸敬

1. はじめに

炭素鎖長6から12の中鎖脂肪酸やそれらからなるグリセリドは様々な利用法から注目されている¹⁾。中鎖脂肪酸トリグリセリドは、ミセルを形成する必要なしに小腸から門脈に吸収されすぐに代謝のエネルギーに変換されるので、手術後の栄養剤として非常に有効である。また、脂肪酸自体、難吸収性の親水性薬物の腸管からの吸収促進剤として坐薬などに利用されている。我々の研究室では、液状の脂質の粉末化について様々な角度から研究している²⁾。筆者は、粉末化された脂質に生理学的機能を付与することを目的として、中鎖脂肪酸やそのグリセリドに着目した。特に、これらの吸収促進の機構はいまだ明らかにはされておらず、薬学の分野でも、今なおトピックスの一つである。吸収促進機構の研究は日本で始められたが^{3,4)}、現在では世界中で研究されている。なかでも、スウェーデンの

会を得た。本稿ではその際の研究結果を中心に紹介をする。

2. Caco-2 細胞を用いた小腸吸収モデル

薬剤や食品成分の腸管から体内への吸収についての研究手法は、古くは、動物を用いた *in vivo* や *in situ*、摘出した腸管を用いた *in vitro* の系が主流であった。しかし、近年、図1に示すようなメンブレンフィルター上に腸管の上皮細胞を培養してその細胞層を隔てた物質の透過を測定することで、吸収過程をモデル化し解析する研究数が急速に増加している⁵⁾。なかでも Caco-2 は、結腸由来の細胞ではあるが、形状や細胞内酵素の発現パターンは小腸の上皮細胞のそれと似ており、とりわけ、発達した細胞間密着帯 (tight junction) を持つ一層の細胞層を形成するので、培養上皮細胞層モデルとして非常に多くの研究者によって利用されている。

このような培養細胞を用いたモデルで最も

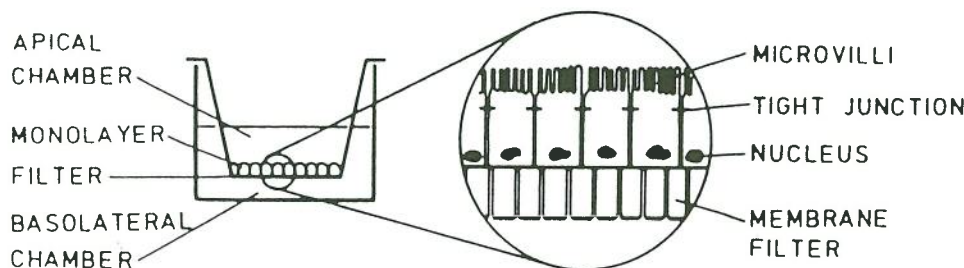


図1 培養上皮細胞系の概念図⁵⁾

APICAL CHAMBER が腸管側、BASOLATERAL CHAMBER が血漿側にあたる。どちらの側からの透過実験の構築も可能である。

ウプサラ大学の薬剤学研究室では Artursson 教授のもと、人の結腸ガン由来の Caco-2 細胞を腸管のモデルに用いて精力的に研究を行っており、筆者はそこで1年間研究を行う機

問題となるのは、実際の生体内での挙動と一致するかどうかである。腸管から体内への物質の吸収過程には様々な段階での障壁があるが、親水性でしかも難吸収性の物質の吸収過程における一番の障壁は、腸管の上皮細胞層である。それ故、上記の培養上皮細胞層モデ

KIMURA Yukitaka

ルは、これらの物質の吸収過程をよく表現するといえる。Artursson ら⁶⁾が、人間の *in vivo* の結果と比較し、透過係数は全く同じではないが、ほとんど同じ傾向を有することを示している。

この培養細胞を用いた実験系は、1) 吸収や代謝過程の迅速な評価が可能、2) 実験条件を揃えやすい、3) 操作が簡便なので一度に大量の実験が可能、4) 細胞内の生理学的な挙動の解析が容易、5) ヒトの細胞での実験が可能、などの利点があり、特に動物実験を制限されている国の企業ではすでに多くの需要がある。

3. 中鎖脂肪酸の作用機構の研究

中鎖脂肪酸の作用機構として、それらの疎水性³⁾やカルシウムとのキレート能⁴⁾が注目されていたが、吸収細胞にどのような影響を与えているかは、ほとんど知られていなかった。Anderberg ら⁷⁾は、炭素鎖長10の脂肪酸ナトリウム (C10) を腸管側にあたる Caco-2 細胞層の上部に加えると、1時間後には全体の3分の1の tight junction の部位に水泡が出現することを見いだした。また、細胞層を C10 に20分だけさらし培地に戻すと、一度ゆるんだ tight junction の機能が回復することも示し、C10 がアクチンフィラメントに参与していることも示唆した。また、Lindmark ら⁸⁾は、C12 の効果は、C10 よりも低濃度で発現し、C10 とは異なり tight junction の形状には変化がないことを示した。ほとんど同じ構造を持った物質に、細胞が異なる応答を示すという事は非常に興味深い。

筆者らは、C10 と親水性薬物のモデル物質 (この実験では蛍光試薬) を腸管側へ加え、血漿側への蛍光試薬の透過量を短い時間間隔で測定し、その透過速度からみかけの透過係数 $Papp$ を算出した。蛍光物質は細胞膜を通過しないので、 $Papp$ の増加は、C10 によって tight junction がゆるみ、そこを蛍光物質が通過するためと考えられる。図2に示したように、今まで効果がないとされていた低濃度 (5mM) でも開始直後から15分間はコン

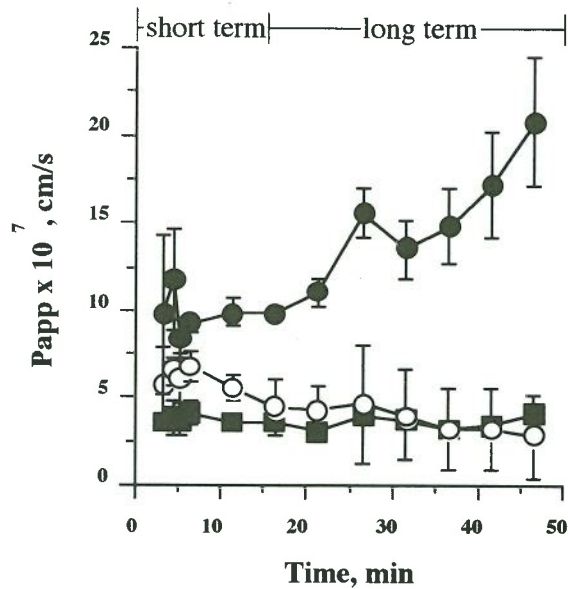


図2 C10の short-term effect と long-term effect
親水性の物質のモデルとして蛍光物質 (fluorescein) を用いた。C10 なし (■) と比較して 5mM (○) では 0~12 分で有意な差 ($P < 0.05$), 13mM (●) では全ての点で有意差 ($P < 0.001$) が得られた。縦軸は物質の透過量ではなく、各時間での透過速度から算出した見かけの透過係数であることに注意。

トロールに比べて高い $Papp$ の値が得られ、促進効果が認められた⁹⁾ (short-term effect)。先の論文^{7,8)}でも効果があった濃度 (13mM) では、同様に一定の $Papp$ を示す short-term effect のあと、15分後から $Papp$ が時間と共に増加した (long-term effect)。これらの結果は、C10 による吸収促進の機構が2段階である可能性を示唆している。

この実験では、すでに2分後には第1段階目の効果が現れていた。そこで、この short-term effect について、細胞層を隔てた電気抵抗 (TER) を数秒の間隔で測定できる装置で実験を行った。TER の低下はイオンの移動性の増大を意味し、特に tight junction のゆるみを反映する。実験の結果 TER 低下は10秒以内に完了し、C10 は非常に速い効果を tight junction にもたらすことがわかった。

4. 細胞内シグナル伝達系への影響

さて、2段階で tight junction に影響する C10 の吸収促進機構はどのようなものか。培養細胞系では細胞生理学的なアプローチが容易であるため、中鎖脂肪酸の促進機構と細胞内シグナル伝達系との関連が研究され始めて

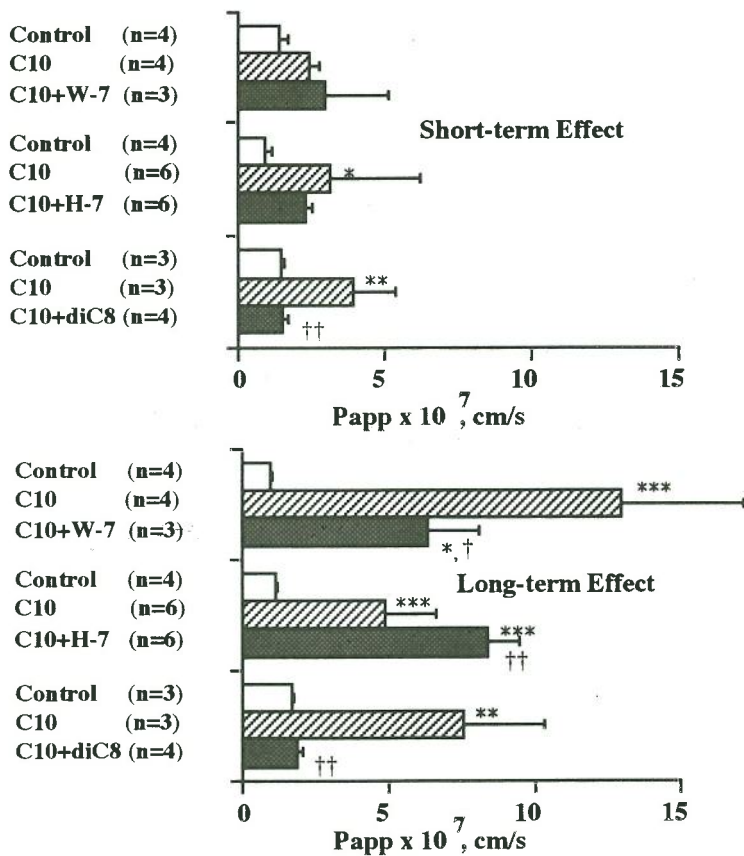


図3 C10 (13mM) による2段階の吸収促進効果に対する細胞シグナル伝達系の阻害剤や類似体の影響

ここでは0~12分をshort-term effect, 12~60分をlong-term effectとした。阻害剤や類似体は本文を参照。透過マーカーには¹⁴C-マンニトールを用いた。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs Control. †P<0.05, ††P<0.01 vs C10.

いる¹⁰⁾。細胞内シグナル伝達系のうち、ホスホリパーゼCを介する二つの伝達経路がtight junctionを支えるアクチンフィラメントなどの細胞骨格に影響を与えるので、これに着目した。それぞれの経路の様々な阻害剤や類似体が、C10の促進機構にどの段階でどの程度影響しているかを調べた(図3)。short-term effectへの影響(図上部)よりも、long-term effectへの影響(図下部)の方が顕著に現れた。つまり、二つのシグナル伝達系路のうち、イノシトール三リン酸の経路のカルモジュリン依存性ミオシンライトチェーンキナーゼの阻害剤(W-7)によって、C10の促進効果は阻害された。一方、もう一つの

ジアセチルグリセロール(DAG)の経路では逆に、プロテインキナーゼCの阻害剤(H-7)が促進効果をやや高めた。また、後者の経路を進めるシグナル物質DAGの類似体であるdiC8を加えると、C10の促進効果はほとんど阻害された。これらの結果は、二つの経路がtight junctionの透過性に関して相反する働きを示すことを示し、興味深い。

5. おわりに

中鎖脂肪酸の吸収促進機構が、2段階であり、そのうち特にlong-term effectに細胞内情報伝達系が関与していることを明らかにした。しかし、どのようにして作用するのか、また、short-term effectについての機構は依然として謎のままである。筆者は、中鎖脂肪酸の物理化学的性質が鍵を握っていると考えており、現在もアプローチを続けている。

文 献

- 1) 原 健次 (1993) 「生理活性脂質の生化学と応用」 幸書房, pp.210
- 2) Matsuno, R. and S. Adachi (1993) *Trends in Food Sci. & Technol.* 4: 256
- 3) Nishimura, K. et al. (1985) *Chem. Pharm. Bull.*, 33: 282
- 4) Yata, N. et al. (1985) *J. Pharmacol. Sci.*, 74: 1058
- 5) Artursson, P. (1991) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 8: 305
- 6) Artursson, P. et al. (1993) *Pharm. Res.*, 10: 1123
- 7) Anderberg, E. K. et al. (1993) *Pharm. Res.*, 10: 857
- 8) Lindmark, T. et al. (1995) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275: 958
- 9) Kimura, Y. et al. (1996) *Proc. Int. Symp. Control. Release of Bioact. Mater.*, 23: 423
- 10) Tomita, T. et al. (1995) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 272: 739

編集後記

キノガサタケ（表紙）は、さすがきのこの女王にふさわしい。黒い帽子と白いドレスをまとった姿は、舞踏会の貴婦人を思わせる。ピントを少しはずしたバックの深い緑は、一層これを引き立たせる。プロの写真かと思っていたが、著者の武田さんの撮影と聞いて感心した。

キノガサタケは中華料理の高級食材で、しかも、コレステロールや脂肪を減らす効果もあるとか、私達の食卓にも上るような培養技

法の完成が待たれる。本誌51号ではホンシメジの人工培養の成功を、また57号ではショウロの増産技術を紹介した。最近フオアグラ、キャビアとともに世界の三大珍味とされてきたトリュッフの短期・大量培養に近大グループが成功したようである。残るはマツタケということになる。マツタケ菌は生きたアカマツに菌根を作って生育するので、人工培養はなかなかの難物らしい。（大畑記）

ブレインテクノニュース（第58号）

平成8年11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