

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

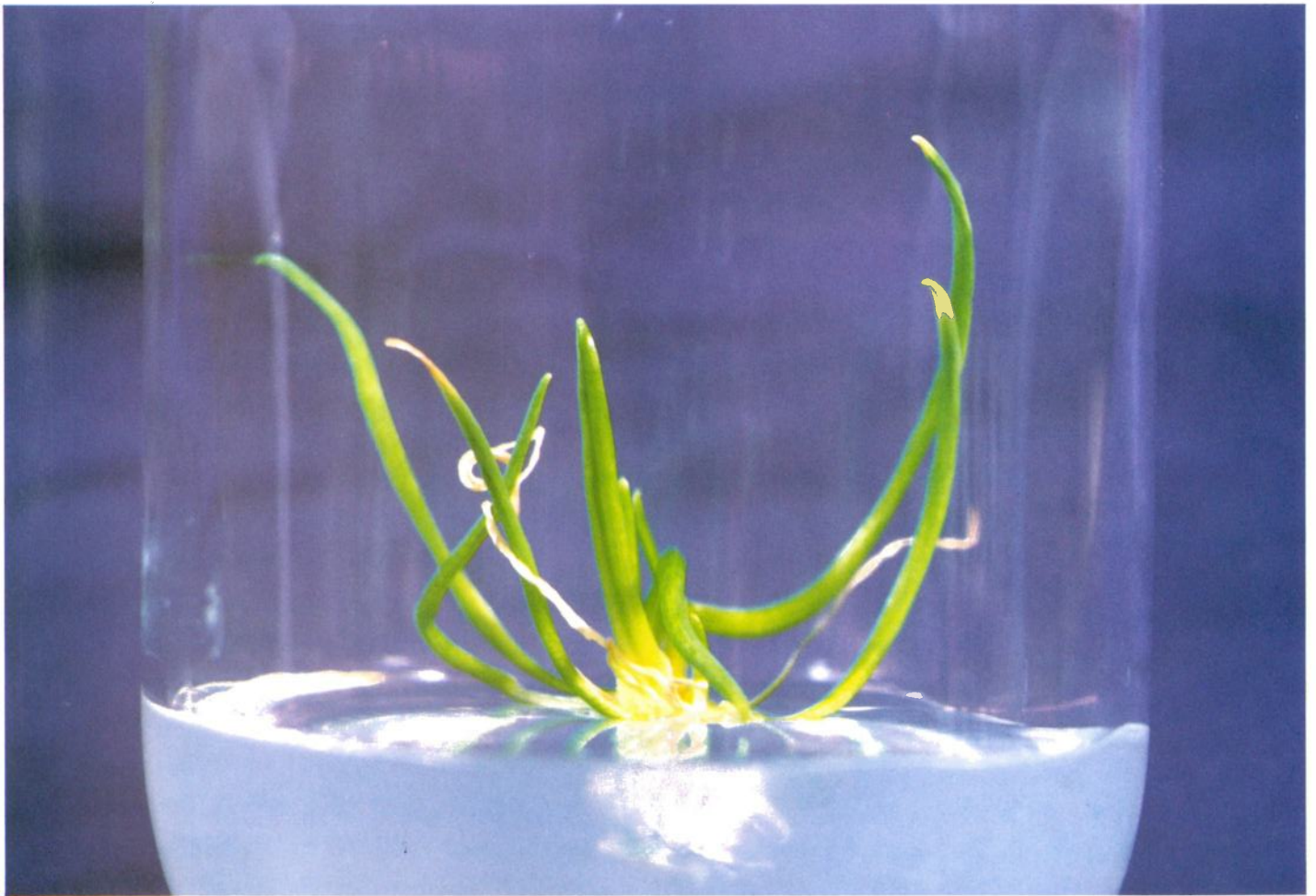
〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 60 号

BRAIN
Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

MARCH 15, 1997



ネギとタマネギの体細胞雑種「ネギタマ」

(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

篠崎和子

植物の環境ストレス耐性と遺伝子応答—乾燥耐性植物の分子育種を目指して—…………… 1

国内情報

太田啓之・下嶋美恵・増田 建・高宮建一郎

高等植物の主要糖脂質の合成を担う糖転移酵素

—その遺伝子クローニングがもたらすもの—…………… 5

川崎信二・秋山康紀

イネの大容量バイナリーシャトルベクターの開発……………10

白田 昭

微生物から青紫色素……………14

林 清・井澤 登

苦味ペプチドを分解するアミノペプチダーゼ……………17

地域の先端研究

下中雅仁

「ネギタマ」の開発……………22

文献情報

大腸菌におけるタンパク質分解の機構……………25

海洋付着生物の着生機構……………25

初期卵胞形成にはたらく卵子分泌因子……………27

吟醸酒の薫り—酢酸エステル合成キー酵素のトピックス—……………27

雌性不稔と交配型が糸状菌の sexual/asexual の構成割合と進化に及ぼす影響……………28

植物の病害抵抗性遺伝子を単離する—PCR 法の適用……………29

海外便り

杉本亜砂子

線虫のプログラム細胞死の研究

—ウィスコンシン大学マジソン校でのポストドク生活—……………31

特別情報

渡邊睦雄

バイオ関連発明の明細書の記載について……………34

植物の環境ストレス耐性と遺伝子応答

—乾燥耐性植物の分子育種を目指して—

農林水産省 国際農林水産業研究センター
篠崎和子

地球温暖化等により世界的規模の環境劣化が国際的に大きな問題となっている。このため、植物への環境ストレス耐性の付与は農業生産問題からも環境問題からも緊要な課題となっている。また、近年の分子生物学の進展により、バイオテクノロジーの手法を用いた育種が可能になりつつある。環境耐性植物の分子育種技術の開発のためには、植物が本来持っている環境耐性機構の遺伝子レベルでの解明が必要である。本稿では環境因子として乾燥を取り上げ、乾燥耐性の機構、特に乾燥耐性に関与する遺伝子の発現機構について概説する。

1. はじめに

熱帯雨林の破壊、温暖化、砂漠化などにより地球レベルの環境劣化がクローズアップされている。また、開発途上国での人口増加は爆発的であり、人口100億時代の到来も考えられている。環境ストレス耐性植物の作出は環境問題に対処するためにも農業生産性の維持、向上のためにも重要な課題となっている。バイオテクノロジーを用いた環境ストレス耐性植物の作出のためには、複雑な植物の生理機能を分子レベルでコントロールすることであり、植物が本来持っている環境ストレス耐性機構の分子レベルでの解明が技術開発のための重要なポイントと考えられる。しかし、環境耐性植物の作出はその耐性機構が解明されていないため、病害虫耐性作物等に比較してその開発が遅れているのが現状である。

植物は移動の自由を持たないため、厳しい環境の変化を耐え抜いて成長分化を続けて行かなければならない。このため植物は環境の変化に速やかに応答し、適応する生理機構を進化の過程で獲得してきたものと考えられる。植物を取り巻く環境因子としては光・高温・低温・乾燥・冠水などによる嫌気的条件・高

塩濃度などが挙げられる。これらの環境因子のうち乾燥（水分環境）は陸上植物にとって、生存に関わる重要な因子の一つであり、植物の成長に大きな影響を与えている。植物は乾燥ストレスを受けると成長が阻害され、種々の生理的過程に影響を受ける。植物では乾燥ストレスに対抗して個体レベル、組織レベルあるいは細胞レベルで種々の応答機構が働くことが明らかになってきている。さらに最近の研究から、遺伝子発現レベルでも植物は乾燥に応答していることが明らかにされつつあり、多くの植物から乾燥ストレスによってその発現が誘導される遺伝子が単離され、機能と発現制御機構の解析が進められている^{1,2)}。

1970年代に遺伝子組換え実験法が開発され動物や植物の遺伝子がクローニングされるようになり、その構造解析研究が始められた。さらに1980年代になり植物に遺伝子を導入する方法、すなわちトランスジェニック植物実験法が開発された。この方法を用いて植物遺伝子の発現制御機構や機能解析研究が活発に行われるようになった。近年では、環境ストレス、例えば温度変化、感染、乾燥、紫外線、嫌気条件などに関係する遺伝子の機能や発現制御の研究が活発に行われている。

我々の研究グループでは乾燥耐性作物の分子育種を目的として、乾燥ストレスによって誘導される遺伝子群の機能と遺伝子の発現制

御, さらに乾燥ストレスによる刺激から遺伝子発現に至るシグナル伝達経路について分子レベルの解析を行っている。乾燥ストレスによって誘導される多数の遺伝子を単離し, その発現を解析することによって乾燥ストレスから遺伝子発現に関与するシグナル伝達系をさかのぼって環境ストレスに対する植物の応答機構のシステム全体を分子レベルで理解しようという姿勢で研究を進めている。また, これらの研究結果をもとに環境耐性植物の作出に役立てていきたいと考えている。

2. 乾燥ストレスにより誘導される遺伝子の機能解析

我々は二種の植物を研究材料として用いている。一つは西アフリカの乾燥地帯で栽培されている豆科の作物であるカウピーである。この作物はサボテンなどのように特別な器官を持っているわけではないが, 非常に強い乾燥耐性を示す。この乾燥耐性の性質を示す遺伝子を明らかにし, これを他の植物に導入することによって乾燥耐性作物の作出に利用できると考えられる。もう一方の植物はモデル実験植物として注目されているシロイヌナズナである。この植物はアブラナ科の1年生草本で, 30cm程の小さな植物であることやゲノムサイズが植物のなかで一番小さいことから, 分子生物学の材料として世界中の多くの研究室で研究されており, 国際植物としての地位を獲得している。

シロイヌナズナとカウピーより乾燥ストレスで誘導される遺伝子のcDNAをディファ

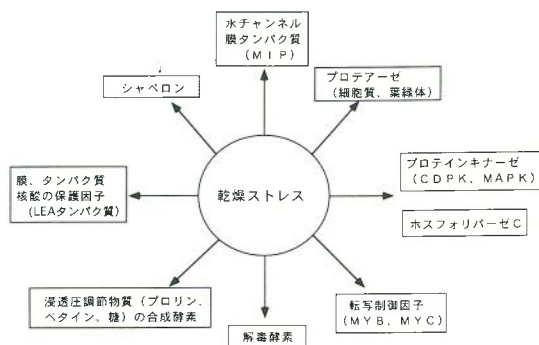


図1 乾燥ストレス応答性遺伝子のコードするタンパク質の植物細胞の乾燥耐性における機能

レンシャルスクリーニング法によりシロイヌナズナから25種類, カウピーから10種類をクローニングした³⁾。乾燥ストレスで誘導される遺伝子群の機能には非常に多様性があり, これらの遺伝子産物の協同作用により, 乾燥ストレスから植物細胞が保護されていると考えられる(図1)。これらの遺伝子産物には水の細胞内輸送に関与する水チャンネルタンパク質, 変性タンパク質の再生, 分解に関与するシャペロン, プロテアーゼが挙げられる。また解毒に関与する酵素, 高分子の保護に関与するデハイドリンなども誘導される。ほかに, 適合溶質である糖やプロリンの合成酵素もストレスにより誘導されることが明らかになった。これらの遺伝子産物が協調的に働き細胞を乾燥から保護していると推定される。米国やドイツの乾燥ストレス耐性について研究しているグループでは, 研究材料として何年も水を与えずからからに乾燥してもいったん水を与えれば一夜にして元に戻る復活植物やCAM植物であるアイスプラントのように乾燥に対して特別な耐性を示す植物を用いて乾燥ストレス時に働く遺伝子の研究を行っているグループがある^{4,5)}。これらの植物を用いた場合も, 我々の研究グループと同様の乾燥誘導性遺伝子群が単離されており, 普遍的に高等植物が陸上化するために獲得してきた遺伝子群であると考えられる。

一方, これらの単離した遺伝子を導入して耐性植物を作出する研究も行われている。プロリン, 糖, ペタイン等の適合溶質の合成酵素の遺伝子を導入して, 塩耐性や低温耐性植物を作出した研究やデハイドリンの遺伝子を導入して乾燥耐性な植物を作出した研究などがある。しかし, これらのストレス耐性植物の耐性度の向上はわずかなものであり, 実際に劣悪環境地帯で栽培可能な耐性度の高い植物を作出するためには, 耐性機構に関与する多くの遺伝子の発現を複合的に変化させることが有効であると考えられる。

3. 乾燥ストレスにおける遺伝子応答

乾燥ストレス応答性の遺伝子の転写レベルでの発現誘導をノーザン法を用いて解析すると、その乾燥ストレスによる発現誘導には植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) を介するシグナル伝達経路と、ABA を介さない経路の少なくとも2つのシグナル伝達系があることが明らかになった (図2)。ABA による遺伝子発現の解析は進んでおり、ABA による発現誘導に関与するシス因子 ABRE (YACGTGGC) が重要な役割を果していることが示され、さらに ABRE に結合する DNA 結合タンパク質 (トランス因子) も同定されている^{6,7)}。しかし、ABA の関与しない発現制御の解析は進んでいなかった。そこで、この後者の発現制御に関与する転写調節因子、特にシス因子と呼ばれる遺伝子上の転写を調節する領域に関して塩基配列レベルでの同定を行った。

乾燥ストレスによって誘導されるシロイヌナズナの RD29 遺伝子の転写開始領域の解析をトランスジェニック植物実験系を用いて行った。転写開始領域と GUS リポーター遺伝子を連結したキメラ遺伝子を作成し植物に遺伝子導入し、環境ストレスによる発現誘導について解析した⁸⁾。その結果、*rd29A* 遺伝子の乾燥、低温、塩によるストレス応答には9塩基の配列 (TACCGACAT) が関与していることを明らかにし、この9塩基の配列を DRE (Dehydration Responsive Element) と命名した。さらに、DRE は ABA による発現誘導には関与しない新しいシスエレメントであることを示した。この配列は他の乾燥や低温で誘導される遺伝子の制御領域にも見いだされており、環境ストレス応答に重要な役割を果していると考えられている⁹⁾。DRE の配列は他の生物のシス配列には相同性がなないので新しいシス制御因子と推定される。

従来から、ABA による発現誘導に関与するシス因子 ABRE が乾燥、塩、低温ストレス応答に重要な役割を果していることが示さ

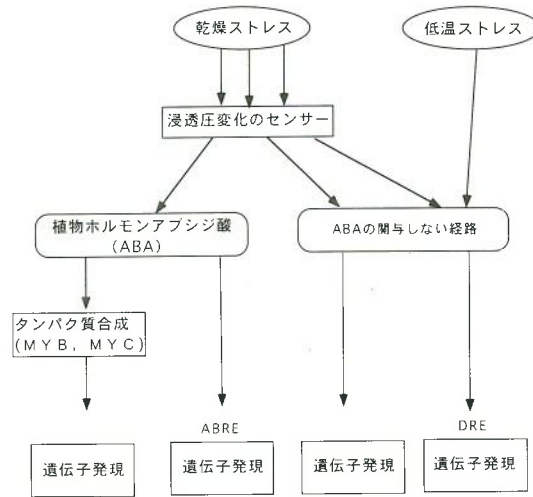


図2 乾燥ストレスから遺伝子発現に至るシグナル伝達系とシグナル伝達に関与する因子

れていたが、我々の研究によりこれらの環境ストレス応答に ABRE 以外の新しいシスエレメント DRE が重要な役割を果していることがはじめて明らかとなった。このようなシス因子に結合する DNA 結合タンパク質のクローニングを進めている。さらに、我々の研究から乾燥ストレスによる遺伝子の発現誘導には、少なくとも4つのシグナル伝達系が関与する複雑な応答をしていることが明らかになった (図2)^{2,10)}。植物は複雑なシグナル伝達経路をもつことで複雑な生理的応答を行っているものと考えられる。

4. 環境シグナルの細胞内情報伝達

環境刺激がどのように細胞内に伝えられ遺伝子の発現を制御しているのか、そのシグナル伝達系を明らかにすることが、現在の植物分子生物学の重要な研究課題の一つとなっている。植物の系でもタンパク質のリン酸化がシグナル伝達に重要な役割を果していることが知られている。またカルシウムやリン脂質などのセカンドメッセンジャーだけでなく、植物ホルモンが環境シグナルの伝達因子として働いている。我々の最近の研究から植物では動物と異なりシグナル伝達に関与する因子の遺伝子の発現が環境刺激により直接影響を受けている事が明らかになった。すなわち、

カルシウム依存性プロテインキナーゼ, MAPキナーゼなどの環境刺激のシグナル伝達に関与する因子の遺伝子が乾燥や低温により転写レベルで誘導されることを示した²⁾。これらのことから, 乾燥ストレスのシグナル伝達系にはMAPキナーゼカスケード, カルシウムカスケードが関与していることが示唆される。植物ではこれらのシグナル伝達因子が環境ストレスにより誘導されて, シグナル伝達の効率が増幅していると考えられる。このようなことは動物などでは報告がなく, 植物が環境ストレスにより遺伝子発現のみならずシグナル伝達にまで直接影響を与えている事が明らかになった。

5. おわりに

これまで述べてきた乾燥ストレス誘導性遺伝子群の解析から, 耐乾燥性の植物の作出へどのような戦略を考えていったらよいだろうか。多くの遺伝子が誘導されて植物細胞を乾燥から保護している。そこで, まずこれらの耐乾燥性遺伝子を効率良く誘導するように改変することが挙げられる。また, 乾燥ストレス耐性機構には多数の遺伝子の複合的働きが必要と考えられるので, 効果的な耐性付与のためには, ストレス耐性の獲得にかかわる複数の遺伝子の発現調節に働く転写制御因子や環境ストレスの受容にかかわるセンサー, その情報を伝えるシグナル伝達系にかかわる遺伝子の改変が有効と考えられる。これらの遺伝子は一遺伝子を改変することで, 下流の多くの耐乾燥性遺伝子の発現を同時に調節できると考えられるからである。このためには,

植物の環境シグナルの受容から遺伝子応答に至る細胞内情報伝達のカスケードの全体像を分子生物学的に解明することが重要である。特に環境ストレスの受容にかかわるセンサーの同定と環境ストレスによる転写調節に関わる調節因子の解明が当面の大きな課題である。さらに, 遺伝学的手法やゲノム解析的手法を用いて植物遺伝子の機能解析, 特に調節遺伝子の相互調節ネットワークのシステム全体を解明し, 環境ストレス耐性作物の開発の基盤研究を進め, 21世紀半ばの人口100億の時代に向けて食糧の増産や環境保全にも寄与したいと考えている。

文 献

- 1) 篠崎和子ら (1994) 植物細胞工学, 別冊 I. 砂漠化防止対策, 18-27
- 2) Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki (1996) *Current Opinion in Biotechnology*, 7: 161-167
- 3) Yamaguchi-Shinozaki, K. et al. (1994) *JIRCAS Journal*, 1: 69-79
- 4) Bohnert, H. J. et al. (1995) *Plant Cell*, 7: 1099-1111
- 5) Bartels, D. and D. Nelson (1994) *Plant Cell Environ.*, 17: 659-667
- 6) Yamaguchi-Shinozaki, K. et al. (1990) *Plant Mol. Biol.*, 14: 29-39
- 7) Guiltinan, M. J. et al. (1990) *Science*, 250: 267-271
- 8) Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki (1993) *Mol. Gen. Genet.*, 238: 97-105
- 9) Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki (1994) *Plant Cell*, 6: 251-261
- 10) 篠崎和子ら (1996) 現代化学, 増刊30, 植物のシグナルトランスダクション, 88-92

国内情報

高等植物の主要糖脂質の合成を担う糖転移酵素 —その遺伝子クローニングがもたらすもの—

東京工業大学・生命理工学部
太田啓之・下嶋美恵・増田建・高宮建一郎

高等植物の葉にはモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) と呼ばれる特徴的な糖脂質が多量に含まれており、MGDG は地球上で最も含量の高い極性脂質であるといわれている。MGDG は葉緑体のチラコイド膜の主要構成脂質であり、光合成機能の発現と密接な関わりを持っていると考えられているが、その生理的役割についてはほとんど分かっていない。最近、この MGDG の合成に関わる糖転移酵素の遺伝子が初めて単離された。この遺伝子単離によって、光合成生物にしか見られないユニークな糖脂質の役割が明らかになることや、新たな有用植物の作出に役立つことが期待される。

1. はじめに

高等植物の葉緑体にはチラコイド膜と呼ばれる高度に発達した膜系が存在し、このチラコイド膜において光合成の電子伝達反応など、植物に欠かせない重要な反応が行われる。このチラコイド膜に含まれる脂質のうちの80%近くは、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) やジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG) と呼ばれる光合成を行う植物や微生物にしか見られない糖脂質であり、広く生物一般の細胞膜やオルガネラ膜に主に存在するリン脂質は、チラコイド膜の10~15%程度を占めているに過ぎない。MGDG はチラコイド膜の主要構成脂質としての機能のみならず、光合成機能の発現にも種々の重要な役割を担っていると考えられているが、その詳細については現在までのところほとんど分かっていない。

MGDG はジアシルグリセロールと UDP-ガラクトースを基質とし、MGDG 合成酵素と呼ばれる糖転移酵素により葉緑体の包膜で合成される。チラコイド膜に含まれるもう一つのガラクトースを含む脂質、DGDG も MGDG を前駆体として生合成されることか

ら、MGDG 合成酵素はチラコイド膜構築のキー酵素として以前からその重要性が指摘されていた¹⁾。我々の研究室では、5年ほど前からキュウリを材料として、葉緑体形成時における糖脂質合成のメカニズムを明らかにすることを目的として研究を開始した。ここでは、この MGDG 合成酵素について近年の我々の研究によって明らかになってきたことについて紹介するとともに、我々が単離した MGDG 合成酵素遺伝子を用いた有用植物作出の可能性についてもふれたい。

2. 葉緑体の形成と糖脂質合成

植物の種子の中には葉緑体はなく、発芽の過程で葉緑体の前駆体であるプロプラスチドから葉緑体が形成される。その際に最も顕著な形態変化はチラコイド膜の形成であるが、チラコイド膜脂質のほとんどが MGDG、DGDG といった糖脂質であることを考えると、チラコイド膜の形成とは脂質形成の側面からいえば糖脂質の合成であるといっても過言ではない。図1はキュウリの発芽過程に見られる MGDG 合成酵素の活性変化と MGDG および DGDG の蓄積を比較したものである²⁾。MGDG 合成酵素活性は、光を当てなくても、暗所発芽4日で発芽前の10倍程度に増加するが、発芽4日目に光を当ててや

OHTA Hiroyuki, SHIMOJIMA Mie, MASUDA Tatsuru, TAKAMIYA Ken-ichiro

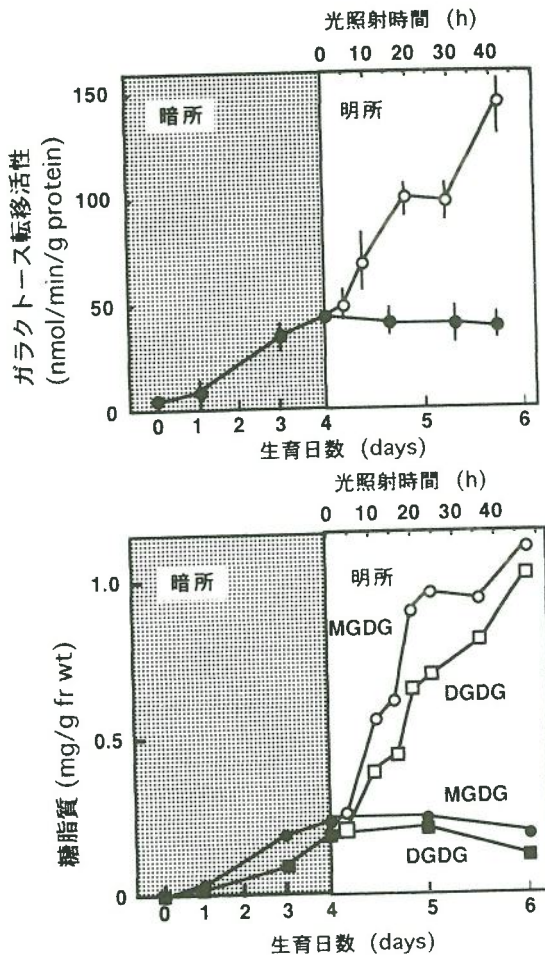


図1 キュウリの発芽過程に見られる MGDG 合成酵素の活性変化と糖脂質の蓄積

4日間暗所発芽させた後、光照射したもの（上図の○、下図の○、□）、と暗所でそのまま生育させたもの（上図の●、下図の●、■）。

ると活性はさらに急激に増大し、光照射42時間で照射前の3倍以上に増大する。また、MGDG および DGDG の蓄積も MGDG 合成酵素活性の増加と同様に進行し、光照射42時間後で光照射前の6から7倍程度の値になる。

このことから、MGDG 合成酵素の活性化が糖脂質の蓄積に重要であることが推察される。また、ここでは示していないが、植物ホルモンとして知られるサイトカニンが MGDG 合成酵素の活性増大に促進的な作用をしめすことも分かっている。このように、MGDG 合成酵素の活性増大が糖脂質の蓄積に重要であること、酵素活性の増大が光やサイトカニン類によって促進されることから、この MGDG 合成酵素の活性発現のメカニズムについてより詳細な知見を得るため、この酵素の精製を開始した。

3. MGDG 合成酵素の単離およびホスファチジン酸による酵素の活性化

MGDG 合成酵素についてはこれまで、フランスの Douce らのグループ³⁾とドイツの Heinz⁴⁾らのグループより、ハウレンソウを材料として10数年の歳月をかけて精製が行われ、それぞれ19kDa, 22kDa のタンパク質を MGDG 合成酵素として同定していた。しかし、葉緑体を包む膜である包膜を精製の出発材料としていたことや、MGDG 合成酵素が包膜中の微量タンパク質であることなどの理由から、タンパク質や遺伝子レベルでのこれ以上の解析は困難をきわめ、ほとんど進展していなかった。そこで、これらの点を克服するため、包膜よりも精製度は低いものの包膜タンパク質を多く含むミクロソーム画分を出発材料として精製を行った⁵⁾。表1は MGDG 合成酵素の精製の結果をまとめたもので

表1 キュウリ MGDG 合成酵素の精製のまとめ

精製ステップ	タンパク質量 (μg)	活性 (nmol/min)	比活性 (nmol/min/mg protein)	回収率 (%)	精製度 (-fold)
可溶化画分	15,000,000	750	0.05	100	1
MCAC ^a	122,000	600	4.9	80	98
Hydroxyapatite	38,500	331	8.6	44	172
Gel-filtration	6,700	263	39	35	780
CM-Toyopearl	170	42.3	249	5.6	4,980
Mono S	55.6	21.8	392	2.9	7,840
UDP-hexanolamine agarose ^b	<1.5	0.83	>550	0.1	>11,000

^a 金属キレートアフィニティークロマトグラフィー

^b Mono S カラム後の最も活性の高いフラクションを使用した

ある。精製には通常暗所で4日間発芽させた後29時間光照射したキュウリ子葉3 kg程度(大型のパンケースで30枚分程度)を用いた。キュウリ子葉からマイクロソーム画分を調製した後、12 mMのラウリルジメチルアミノキシド(LDAO)を用いて酵素を可溶化し、165,000xgの遠心により得た上清を金属キレートアフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイト、トヨパールHW-55によるゲルろ過、CM-トヨパール、Mono S、UDP-ヘキサノールアミンアガロースによるアフィニティークロマトグラフィーにより酵素を精製した。ところがこのようにして精製した酵素の分子量は47kDaであり、意外にもハウレンソウでのこれまでの報告と全く異なる結果となった。

また、フランスのDouceらのグループは、CHAPSで可溶化した酵素が活性発現に脂質要求性を示すことを報告しているが⁶⁾、LDAOで可溶化したキュウリのMGDG合成酵素でも同じような脂質要求性が認められることがわかった。キュウリのマイクロソームからLDAOで可溶化したMGDG合成酵素は、可溶化の際に脂質が除かれるため、著しく活性を失なうが、可溶化した酵素にマイクロソーム画分から抽出した脂質を再添加すると再び活性を回復する。酵素の活性化に対するこれらの脂質の効果を詳しく調べたところ、スルホキノボシルグリセロール(SQDG)、ホスファチジルグリセロール(PG)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジン酸(PA)などの酸性の糖脂質やリン脂質、オレイン酸ナトリウムなどが高い活性化能を示した。また、酸性脂質の中でも特にPAについては、200 μ M以下の低濃度で酵素の活性化を顕著に引き起こすことが分かった。ちなみに、PG、PIやSQDGなど他の酸性脂質はこのような低い濃度ではほとんど酵素の活性化を示さない。Douceらのグループは、これまで、MGDG合成酵素の活性化因子としてPGを見だし、この酵素の活性発現にPGが重要であると報告しているが⁶⁾、これまで示した知見から、MGDG合成酵素の活

性化にはPGではなく葉緑体の微量脂質であるPAが必須であると考えている。このことは、植物の葉緑体の形成における膜脂質の合成が膜中に存在する微量脂質によって制御されている可能性を示しており、極めて興味深い。

4. MGDG合成酵素遺伝子のクローニング⁷⁾

キュウリ子葉から、酵素の大量精製を行い、岩松の方法⁸⁾によりポリビニルピロリデン膜にプロットしたタンパク質の内部アミノ酸配列を決定した。決定したアミノ酸配列の情報を基にオリゴヌクレオチドを合成し、cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。単離したcDNAの解析を行ったところ、最初に単離したcDNAは開始コドンを欠いていたが、5'-RACE法により完全長の塩基配列を決定することができた。また、プロテアーゼ消化により得られたペプチドのアミノ酸配列の解析との比較から、推定アミノ酸配列中には、422残基からなる成熟タンパク質部分と103残基からなる葉緑体への移行シグナルの部分を含んでいることが分かった。

このように、キュウリから精製した47kDaのタンパク質に対応するcDNAのクローニングに成功したが、この段階でも、我々はこのcDNAが本当にMGDG合成酵素をコードしているのかどうか決定的な確信をもつことはできなかった。その理由は、キュウリとハウレンソウ間でのあまりにも大きな分子量の違いにある。前述のように、ハウレンソウでこの酵素を10数年にわたって研究してきた2つのグループは、多少の差はあれいずれも20kDa前後の比較的小きなタンパク質をMGDG合成酵素であるとしてきた。ハウレンソウとキュウリの違いはあるにせよ、この分子量の隔たりはこれと同じ酵素と呼ぶにはあまりにも大きかった。そこで我々が単離した47kDaのタンパク質がMGDG合成酵素であるというより決定的な証拠を得るため、このタンパク質を大腸菌で発現し、MGDG合成酵素活性を示すかどうかを調べた。先に示

した成熟タンパク質の部分をグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質として大腸菌で発現させ、MGDG 合成活性を調べた。図2の左の2つは、ベクターのみ

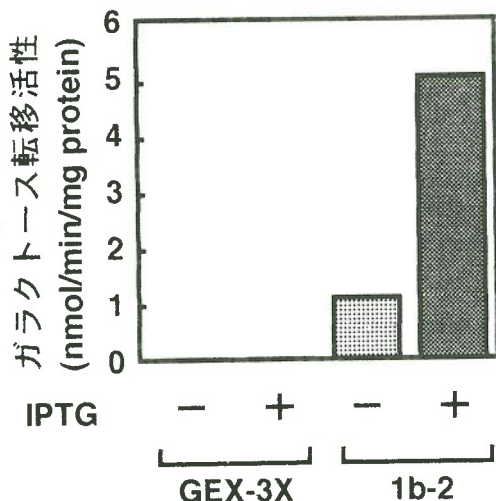


図2 MGDG 合成酵素を導入した大腸菌抽出液のガラクトース転移活性

IPTG により、タンパク質発現を誘導した場合：+、誘導しない場合：-、GEX-3X：ベクターのみを導入した大腸菌、1b-2：MGDG 合成酵素を挿入したベクターで形質転換した大腸菌

でトランスフォームしたコントロールで、当然のことながら大腸菌は MGDG を持たないため、MGDG 合成酵素活性は全く検出できない。ところが、この cDNA を組み込んだものでは、イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトシド (IPTG) でタンパク質合成の誘導を行わなくても MGDG 合成酵素活性を示すことが分かった (図2, 3番目のレーン)。また、この活性は、IPTG 添加により5~8倍程度に増加した (図2, 4番目のレーン)。さらに、ここでは示していないが、この反応生成物が間違いなく MGDG であることも薄層クロマトグラフィーにより確認した。以上のことから、ようやく、我々の単離した cDNA が間違いなく MGDG 合成酵素をコードする cDNA であることが分かった。

また、驚いたことにこの MGDG 合成酵素を大量発現した大腸菌では、全極性脂質中の17%が本来大腸菌には全く含まれない MGDG であることも分かった。通常大腸菌は膜脂質の80%程度がホスファチジルエタノールアミン (PE) であり、その他、PG とカルジ

オリピンをそれぞれ10%程度有している非常に単純な脂質組成を示す。それに対して、MGDG 合成酵素を過剰発現した大腸菌では、細胞内でも MGDG が蓄積し、それに応じて、PE,あるいはPGの含量が減少していることが分かった。大腸菌の脂質組成がこれだけ大きく変わってくると膜構造そのものが大きく変化していることが予想されるが、事実、この大腸菌は、細胞どうしが互いに接着した奇妙な形態をとっている (未発表)。この大腸菌の形態変化が MGDG の蓄積とどのように関わっているかについても大変興味深いところである。

5. 高等植物の MGDG 合成系と葉緑体の分子進化

今回単離した MGDG 合成酵素の推定アミノ酸配列をもとに、データベースの検索を行ったところ、ラン藻や大腸菌など、バクテリアのペプチドグリカンの生合成のキー酵素である MurG と20%弱の相同性を有していることが分かった。ちなみに、データベースの検索ではこの酵素以外の他の糖転移酵素とは有意な相同性は見つかっていない。MurG はペプチドグリカンの代謝中間体にアセチルグルコサミンを転移して、ペプチドグリカンの基本骨格となる糖脂質を生成する糖転移酵素であり、大腸菌の場合、細胞膜の内側に弱く結合した膜酵素であることが知られている。また、キュウリの MGDG 合成酵素とバクテリアの MurG はいずれもリジン含量が高く、高い理論的 pI 値を示し、塩基性タンパク質であると考えられる。これらのことから、MGDG 合成酵素は葉緑体の包膜に弱く結合する膜表在性のタンパク質であると考えられる。

このように葉緑体の主要膜脂質の合成酵素がバクテリアの細胞壁の合成酵素と相同性が見いだされたことは、細胞内共生による葉緑体の進化のメカニズムを考察する上でも極めて興味深い。図3は葉緑体の糖脂質合成系の進化に関する我々の知見を模式的に示したものである。よく知られているように、葉緑体

はラン藻などの光合成微生物が真核細胞に取り込まれたのち細胞内共生により形成したオルガネラであると考えられているが、葉緑体の起源となった光合成微生物が真核細胞に取り込まれた際、光合成微生物自身が持っていたペプチドグリカン合成系が共生の過程で不必要となり、MGDG 合成酵素に機能転換することによって、高等植物が高度に発達したチラコイド膜をもつようになったと考えられる。今後、この遺伝子については細胞内共生による葉緑体の進化の研究に関する一つの指標となるのではないかと考えている。

6. MGDG 合成酵素遺伝子の利用

MGDG 合成酵素遺伝子の単離が行われたことで、今後、植物の葉緑体に存在する膜脂質の組成を大きく変化させた形質転換植物の作出が可能になったと考えられる。MGDG と DGDG の 2 つの糖脂質は、葉緑体内のチラコイド膜のスタッキングに重要な役割を担っていると考えられているが、こういった形質転換植物の解析によって、MGDG の葉緑体内での機能が明らかになることが期待される。また、葉緑体の糖脂質中には不飽和脂肪酸が多量に蓄積されており、葉緑体膜の物理化学的性質に大きな寄与をしている。植物は移動ができないため、温度環境の変化に対して膜脂質の脂肪酸の不飽和度を変えることで膜の流動性を変化させ、温度環境の変化に適応しているといわれている。事実、葉緑体内の不飽和脂肪酸の含量を増加させた形質転換植物で耐冷性が向上した例が幾つか報告されている¹³⁻¹⁵⁾。形質転換により葉緑体中の糖脂質の含量を自在に変えることができれば、不飽和脂肪酸の含量を変化させることにもつながら、植物の温度に対する適応性をより向上させることができるかもしれない。また、ストレスによる葉の損傷の修復能を向上させたり、光合成の機能発現に対してより適切な膜環境を作ることも期待できる。

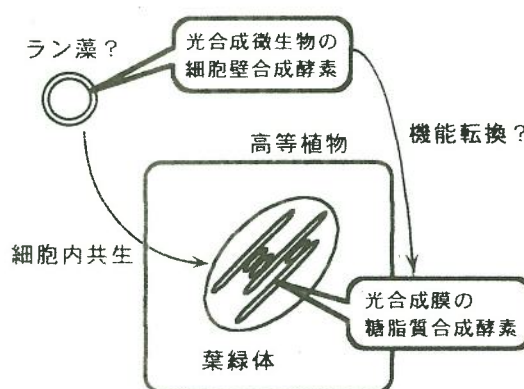


図3 高等植物の葉緑体膜主要糖脂質合成能獲得のモデル

7. おわりに

以上、植物の主要脂質である MGDG の合成酵素について、その葉緑体形成との関わり、酵素の性質、またそのクローニング、さらには、応用面での展望について述べてきたが、今後は、葉緑体の糖脂質含量を変化させた形質転換植物の解析等の手法を用いて、植物、特に葉緑体における MGDG あるいは MGDG 合成酵素の機能を、基礎と応用の観点から明らかにしていきたいと考えている。

文 献

- 1) Joyard, J. and R. Douce, (1987) *Biochemistry of Plants*, eds. P. K. Stumpf, (Academic Press, New York), pp.215-274
- 2) Ohta, H. *et al.* (1995) *Plant Cell Physiol.*, 36 : 1115-1120
- 3) Maréchal, É. *et al.* (1991) *C. R. Acad. Sci. Paris*, 313 : 521-528
- 4) Teucher, T. and E. Heinz, (1991) *Planta*, 184 : 319-326
- 5) Ohta, H. *et al.* (1995) *Plant Lipid Metabolism*, eds. J. -C. Kader and P. Mazliak (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht), pp.152-155
- 6) Covès, J. *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 4966-4970
- 7) Shimojima, M. *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 : 333-337
- 8) Iwamatsu, A. (1992) *Electrophoresis*, 13 : 142-147

- 9) Kaneko, T. *et al.* (1996) *DNA Res.*, 3 : 109
 10) Miyao, A. *et al.* (1992) *Gene*, 118 : 147-148
 11) Mengin-Lecreulx, D. *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18 : 2810
 12) Ikeda, M. *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18 : 4014
 13) Murata, N. *et al.* (1992) *Nature*, 356 : 710-713
 14) Kodama, H. *et al.* (1994) *Plant Physiol.*, 105 : 601-605
 15) Ishizaki-Nishizawa, O. *et al.* (1996) *Nature Biotech.*, 14 : 1003-1006

国内情報

イネの大容量バイナリーシャトルベクターの開発

農林水産省 農業生物資源研究所

川崎信二・秋山康紀*

植物における遺伝子のポジショナルクローニングの効率化のために、大きなゲノム断片を導入できる大容量バイナリーシャトルベクターを開発した。これまでに40kb以上のヒトのゲノム断片をイネに導入する事に成功しており、特に導入断片の再編成が起らず、ほとんどそのままの形でイネゲノムに導入されることが大きな特徴である。操作は簡単で効率も稔性も高く、より大きな断片の導入や他の植物での利用も可能と考えられる。

1. はじめに一植物での遺伝子のポジショナルクローニング

ポジショナルクローニングの手法は染色体上の位置情報だけを用いて遺伝子のクローニングを行なうもので、これまでの生化学的手法では単離が困難であった発現量の少ない遺伝子、特に情報伝達や形態形成等の調節機能に特化した遺伝子群の単離に強力な武器になることが期待される。また、作物の収量や収穫物の品質等の重要な農業形質を決定する遺伝子群も QTL 解析等の手法で個別の遺伝子として遺伝学的に同定・分離された後は同じ手法でそれぞれを単離することが可能であり、生物学や農業に大きな革命をもたらすものである。

ポジショナルクローニングの過程は、1) 目的遺伝子の位置を核酸マーカーを用いて精密にマッピングする、2) BAC ライブラリー等の植物ゲノムの大きなインサートを持ったラ

イブラリーを作製する、(目的に合った既存のものがあればそれを利用)、3) 遺伝子の両側にある核酸マーカーをつなぐような隣接した一連のクローンの集合 (contig) を確立する、4) contig 内で目的遺伝子を探索する、等のステップからなる。特に4)のステップでは遺伝子を含む候補領域を植物に形質転換して、目的の形質が得られること (相補性検定) が遺伝子の最終的な証明として重要である (図1)。

植物の中では、*Arabidopsis* と並んでゲノムサイズが小さく (430Mb)、遺伝学的距離と物理的距離の比率も小さい (約300kb/cM) イネが、遺伝学的なデータが豊富なこともあってポジショナルクローニングに適したものとして注目されてきた。しかし、最後の相補性検定においては、双子葉植物ではバイナリーコスミド等による20kb程度の形質転換が行なわれているのに対し、イネではこれまでは遺伝子銃による単独遺伝子の形質転換による例しかなく、技術上のボトルネックとなっていた。また一般にコスミドベクター

KAWASAKI Shinji, AKIYAMA Yasunori

* : 現大阪府大 農学部 応用生物化学

ではインサートの脱落が起こりやすく、大きなインサートを保持させるためには必ずしも適したベクターとは言えない。通常の形質転換でもイネのプロトプラストを用いた系は高度の熟練を必要とし、しかも低い再生率や高い頻度の奇形・不稔の発生に悩まされることが多い。

我々は、イネのいもち病抵抗性遺伝子の単離を目的としてこれまでに同遺伝子の精密マッピングを行ない^{1,2)}、平均インサートサイズ 155kb で7ゲノム相当のイネのBAC (バクテリア人工染色体) ライブラリーを完成させている³⁾。次の段階としてイネにおけるポジショナルクローニングの最終段階の相補性検定の効率を大巾に向上させる必要に迫られ、新たに大容量のバイナリーシャトルベクターを開発した。これにより、数百 kb の contig 領域のなかから目的遺伝子の存在領域を数十 kb に絞り込み、さらに狭める事によって最終的な遺伝子の同定を行なう事が可能となった。このベクターの利用はイネに限られるものではなく、単子葉植物を含む各種の作物で様々な目的に使用可能と考えられ、広く植物の形質転換にも利用して頂きたいと願うものである。

2. イネ用バイナリーベクターの試作

最近イネでも *Agrobacterium* による形質転換が可能なる事が示されたことから^{4,5)}、我々は pBI121 を基本とするこのシステムを相補性検定用に使えるようにするために幾つかの新しいベクターを開発した。すなわちイネではカナマイシンが発根阻害等を起こす恐れがあるのでハイグロマイシン耐性遺伝子 (*Eco RI* サイトを持たない) を、また早期の形質転換をトランジェント活性も含めてモニターできるようにイントロン入りの *GUS* 遺伝子を導入したベクターを構成した。さらに、ゲノム断片の挿入部には pBluescript のマルチクローニングサイトを持った *Lac Z* を用いてインサートの入ったクローンの確認を容易にした。図2に示すように幾つかのク

ポジショナルクローニングの概要


1. 遺伝子の位置の大まかな見積もり。
(遺伝子の存在範囲)
染色体
核酸の位置マーカー
Pi (遺伝子の存在範囲)
 2. 遺伝子の位置の精密なマッピング。
染色体の1部の拡大
Pi (遺伝子の位置)
 3. 近傍の BAC ライブラリー等によるフィジカルマップの作製。
Pi
BACクローンの contig
 4. 部分領域の形質転換による遺伝子領域の絞り込み。
領域 A B C D E F G
形質 - - - + - - -
 5. 絞り込まれた領域内における ORF の探索とそれによる形質転換。
領域 D
ORF 
形質 Pi + - -
- (4、5で大容量バイナリーベクターが役に立つ。)

図1 ポジショナルクローニングの概要

ローニングサイトはユニークなものとなっている (pBIGZ)。同時に、cDNA を用いての形質転換も行なえるように、*lacZ* に代えてクローニングサイトの前後に35S プロモーターと Nos ターミネーターを持つベクターも開発し、各種の遺伝子を単独で導入するための体制も整えた。これらのベクターの入った宿主菌の選抜はハイグロマイシンで行なっている。

イネの形質転換には胚盤カルスと上記の各種ベクターでインサートの入っていないものをモニター用のベクターに用いて、これまでの方法を参考にしながら、*GUS* 活性の発現を指標として、多くの改良を加えた方法を確立した。これによって、全く細胞培養の経験のない人でも十分な効率で形質転換体が得られることを確認している⁶⁾。

3. ベクターの大容量化

これらのシステムを用いて長いインサートの導入を検討した結果、一部の例外的な場合を除いて10kb以上のインサートを持った pBI 系のベクターは大腸菌では維持されるが、

表 1 Ri 複製起点を持った大容量ベクター pBIGRZ によるイネの形質転換特性と Ri を持たないベクターとの比較

ベクター	インサートとそのサイズ (kb)	EHA 101 でのプラスミド保持	共存培養後の GUS のトランジェント発現率	再分化率 (カルス当り)
	ヒトゲノム 10	+	83 (%)	0 (%)
pBIGZ	30	+	0	0
	(Ri 起点なし) 40	-		
pBIGRZ 1*	ヒトゲノム 40	++	67-92	13-81
pBIGRZ 2*	ヒトゲノム 40	++	63-73	19-45

* pBIGRZ 1, 2 では Ri 起点の向きが異なる (図 2 参照)。

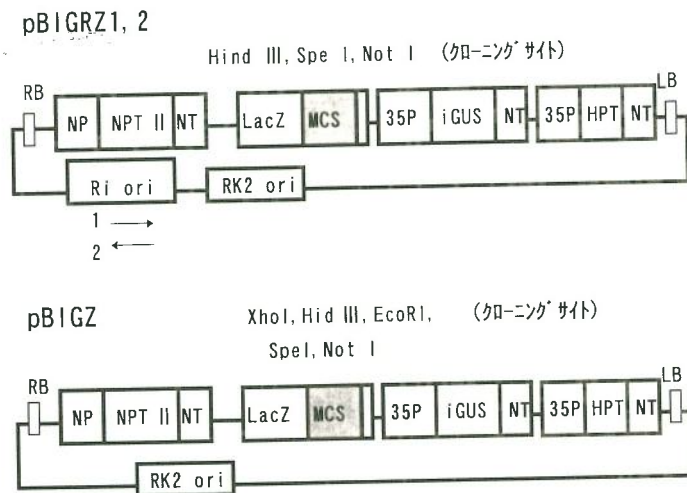


図 2 大容量バイナリーベクター (pBIGRZ) のコンストラクト

NPT II : 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, GUS : イントロ入り β グルクロニダーゼ遺伝子, LacZ : β ガラクトシダーゼ遺伝子, 35P : 35S プロモーター, NP : NOS プロモーター, NT : NOS ターミネーター, MCS : マルチクローニングサイト, Ri ori : Ri プラスミド複製起点

Agrobacterium (EH101株) では安定な維持は難しい事が明らかになった (表 1)。少なくとも RK2起点だけでは目的が達せられない事が示されたので、それに代わるものとして 200kb 前後の Ri プラスミドを維持している Ri 複製起点を付加して用いることを試みた (pBIGRZ1,2 : 図 2)。

λDNA の 27kb 断片の試みでも, Ri 複製起点の効果は著しく, 大腸菌内でも高分子プラスミドの安定性が大きく増し, 通常のアリライシス法で大量のベクターを回収することが出来た。また得られたベクターをエレクトロポレーション法で *Agrobacterium* に導入しても, 安定して維持されることが示された。*Agrobacterium* への導入はトリパレ

ント法を用いても可能と考えられる。

このベクターの形質転換能を調べる目的で, ヒトのゲノムの既知領域を 39~44kb のインサートにもつコスミドからインサート部を pBIGRZ に導入してみたが, やはり *Agrobacterium* 中でも安定に維持され, さらにイネカルスとの共存培養により, 通常の数 kb の遺伝子とほとんど変わらない効率で形質転換個体が得られた (表 1)。Ri 起点の方向による安定性・形質転換能の差は認められなかった。

この様にして得られた形質転換個体のサザンプロットを行なったところ, 図 3 に示すようにコントロールとして示したプラスミド上のインサートと全く同じ切れ方のゲノミックのサザンプロットが得られた。すなわち, ほとんどインサートの再編が起らずにゲノムへの導入が起きている。これにより, 挿入されたゲノム断片の機能を遺伝子の切断や挿入などを恐れずに検定する事ができる。これまでの小さな遺伝子の導入でもプロトプラストへの物理的導入法では遺伝子が断片化する事が知られており, 大きなゲノムインサートの安定的な導入には生物学的な機構が必須と考えられる。

得られた形質転換体の稔性率は 7~8 割はあり, 実った穂は頭を垂れる (図 4), 種子でもハイグロマイシン耐性は安定して維持されていた。以上のことから, ベクター pBIGRZ はイネにおけるポジショナルクローニングにおける相補性検定に必要な諸条件を備えていることが確かめられた。実際に用いる際には, BAC 等ゲノムライブラリーの

contig 構成クローンから目的領域を適当な酵素で切出してこのベクターに移し換えてその機能を検定する事になる。シャトルベクターであるのでライゲーションを行ったベクターをまず大腸菌に導入してインサート領域のチェックを行ない、その後で *Agrobacterium* に移して植物の形質転換を行なうことが出来る。

4. おわりに

最近開かれた、Plant and Animal Genome 5 の会議においても、家畜・家禽・樹木まで含めてほとんどあらゆる農業生物において有用遺伝子のマッピングとそのクローニングの試みが始まっている。植物においては、ここで紹介したベクターは、ポジショナ

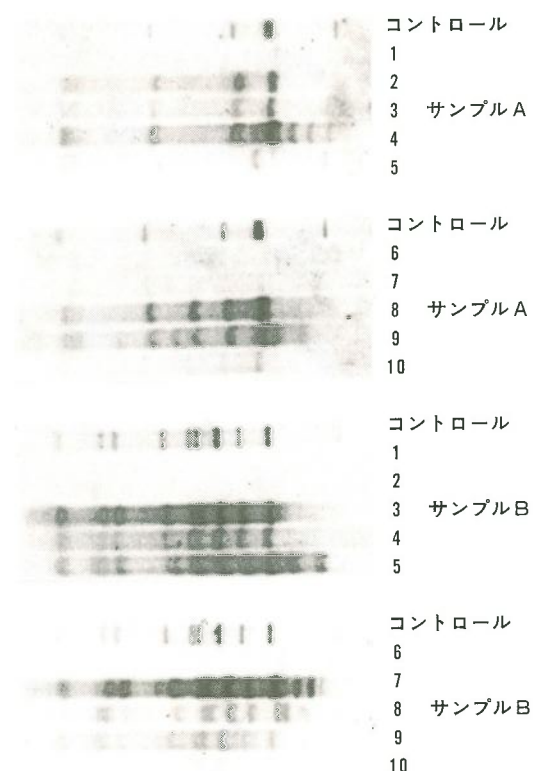


図3 大容量ベクターによるヒトの既知ゲノム断片39kb (A), 44kb (B)のイネへの導入
各々ハイグロマイシン耐性を示した再生個体1-10についてサザンブロットを行なった。コントロールレーンはゲノムに対して1コピー相当の量の元のヒトゲノムインサート。PCR 等によるチェックは行わなくても、再生個体の約6割でほぼ1コピー分のゲノム断片が再編成を受けることなく導入されていた。



図4 44kb のヒトゲノムインサートを持ったイネの形質転換個体
稔性が高く、実った穂(右)は頭を垂れる。左は花。

ルクローニングの最終段階で遺伝子の単離に大きな力になるものと思われ、日本でもイネを始めとして、多くの作物で遺伝子のポジショナルクローニングの試みがなされる事を強く期待するものである。最近 Hamilton らも BAC と Ri の起点とを持った BiBAC ベクターによるタバコの形質転換を発表しているが⁷⁾、イネでの記録はなく、日本での防衛的な特許出願をしている⁶⁾本ベクターの意味は大きいと考える。

文 献

- 1) Miyamaoto M, I. Ando, K. Rybka, O. Kodama and S. Kawasaki (1996), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 9 : 6-13
- 2) Rybka K., M. Miyamoto, I. Ando, A. Saito and S. Kawasaki. *Mol. Plant Microbe Interact.*, (in press)
- 3) Nakamura S, S. Asakawa, N. Ohmido, K. Fukui, N. Shimizu and S. Kawasaki. *Mol. General Genet.*, (in press)
- 4) Hiei Y, S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro (1994) *Plant J.*, 6 : 271-282
- 5) 横井修司・鳥山欽哉・日向康吉 (1996) 植物組織培養, 13 : 81-84
- 6) 特願平 8-255184, 秋山康紀・川崎信二 育種学雑誌, 46, S2, p50
- 7) Hamilton CM., A. Frary, C. Lewis and ST. Tanksley (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 9975-9979

国内情報

微生物から青紫色素

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所
白田 昭

青く汚染した絹糸から、細菌 *Janthinobacterium lividum* が分離された。この細菌の生産する青紫色素は、絹、羊毛、綿などの天然繊維だけでなく、ナイロン、アセテートなどの化学繊維をも鮮やかに染色する。色素の主成分は violacein で、細菌の培養によって大量に得られることから、衣服類の染料としての利用が期待される。

1. はじめに

衣料用の染色剤としては、化学技術の進歩に伴って合成色素が主流をなしている。しかし、天然色素も、穏やかな風合いに染まることから依然として人気が高い。ところが、青紫系の天然色素は昔から少なく、強い憧れがあった。紫系の天然色素としては、アクキガイ（悪鬼貝）から採取される貝紫が有名だが、極めて高価で、大量生産も困難である。

今回、汚染した絹糸から細菌を分離したが、その細菌が生産する青紫色の色素は、絹をはじめ多くの繊維を染めることができた。色調や風合いもよいことから、染色剤として有望と考え、現在、特許を申請中である。

2. 青紫色を生産する細菌

研究の発端は、群馬県で繭の仕事をしている小島篤氏（葉屋サイエンス・ファーム）からの持込みであった。絹の屑糸を濡れた状態で数か月間放置しておいたところ、糸の一部が青く変色したという。その原因を調べて欲しい、というのが彼の依頼であった。絹糸は悪臭を放っていたが、青紫色の輝きには心惹かれるものがあった。

SHIRATA Akira

(1) 細菌の分離

青変の原因は微生物にあるのではと考え、各種培地を用いて細菌の分離を試みた。2～3日後には黄色や灰白色の細菌集落が数多く形成されたが、青紫色の集落は見られなかった。しかし、1週間ほど観察を続けたところ、一部の培地上に青紫色の小さな集落が出現した（図1）。これが原因細菌であった。

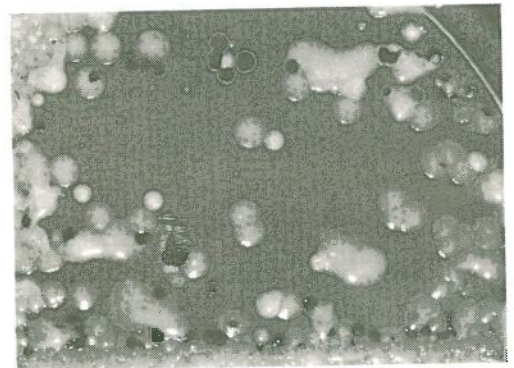


図1 ジャガイモ半合成寒天培地での細菌の分離
濃いコロニーが青紫色素生産細菌

純粋培養すると、5～6日で謄写版用のインクのような濃い青紫色を呈する。

(2) 色素の生産条件

色素の生産性は培地によって異なり、培地を生産性の高い順に並べると、①ジャガイモ半合成培地（脇本培地）、②繭糸煎汁培地、③キングB培地およびペプトン培地、④ジャガイモ・スクロス培地であった（図2）。また、色素生産の最適温度は25°Cであった。

色素の生産性を、液体培地を用いた振とう

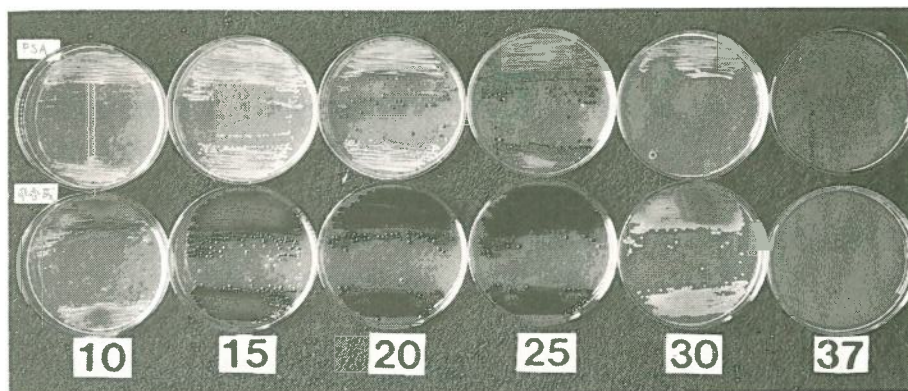


図2 *J. lividum* の各温度での増殖と色素生産

上段は PSA 寒天培地, 下段はジャガイモ
半合成寒天培地

培養と固体培地で比較すると、固体培地の方が優れ、集菌および色素の抽出も液体培地に比べ容易であった。

(3) 細菌の同定

分離菌株(S9601)を同定するため、細菌学的性質を調べた。本細菌はグラム陰性の好気性桿菌で、鞭毛をもち運動性を有する。硝酸塩の還元能、 β -グルコシダーゼ活性およびオキシダーゼ活性は陽性だが、アルギニンジヒドロラーゼ活性、ウレアーゼ活性、 β -ガラクトシダーゼ活性、ゼラチナーゼ活性、インドール産生およびVP反応は陰性であった。これら細菌学性質を既報および分譲頂いた菌株の性質と比較し、*Janthinobacterium lividum* と同定した¹⁾。

3. 青紫色素の抽出と染色

(1) 有機溶媒での抽出と染色

分離細菌を半合成寒天培地に塗布し、1週間培養した後、濃い青紫色になった細菌菌体を小型ピーカーに取り、各種有機溶媒で抽出した。その結果、色素の抽出性は、テトラヒドロフランが最も優れ、次いでメタノールであった。アセトン、酢酸エチルやエーテルではあまり抽出されず、水ではほとんど抽出されなかった。

つぎに、抽出して風乾した色素をいろいろな有機溶媒に溶かした。その溶液に絹および木綿布を浸漬し、溶液中での染色性を調べた。その結果、メタノールとエタノール溶液中で

良く染色された。そこで、細菌の集落をメタノールで抽出し、その抽出液に直接布を浸したところ、布は鮮やかな青紫色に染色された。

このことから、メタノールは、色素を菌体から抽出するが、布へは吸着させる性質をも有しており、抽出および染色を同時に行える溶媒であると判断された。

(2) 色素の単離と構造

抽出した色素をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン：テトラヒドロフラン：アセトン＝4：2：1）および逆相の高速液体クロマトグラフィー（70%メタノール）で分画したところ、青紫色素2成分が単離された。FAB-MSにより分子量はそれぞれ343および327と決定され、¹H、¹³C NMR、IR、およびUVスペクトルデータが文献値^{2,3)}に一致したことから、2成分はviolacein およびdeoxyviolacein と同定された。

violacein は抗生物質の一種であり、グラム陽性菌、カビ、酵母に抗菌活性性を有するという。なお、violacein は本細菌だけでなく、*Chromobacterium violaceum* 等でも生産されることが知られている¹⁾。

4. 染色法と繊維

(1) 染色法の検討

染色は、きれいに仕上がるなら簡単な方が良い。この観点から、いくつかの方法を検討した。その結果、抽出液を用いる方法と菌体を用いる方法が実用的であった。

抽出液染色法は、染色は極めて簡単で、①絹布をメタノール抽出液に半日浸漬し、②水洗後、③陰干しする、の3行程だけであり、素人でもムラなく染めることができる。

菌体染色法は、寒天培地ごと菌体を鍋に移し、等量の水を加えて煮沸する。90～80℃になった液に布を3分間浸漬して染色し、水洗後、陰干しする。染色液の温度が高いと染めが速く進むため、浸漬時間は3～5分でほぼ完了する。

(2) 繊維の種類と染色性

染色性も繊維の種類によって異なり、最も染まりやすい繊維はナイロンで、ついでアセテート、ビニロン、生糸、綿、羊毛であり、レーヨンはわずかに染まり、アクリルとポリエステルはほとんど染まらなかった。

色調は繊維の材質によって多少異なり、絹、羊毛、綿などの天然繊維は青紫色に、ナイロンは紺色に、アセテートは紫色に染色される。

また、染色液中の色素濃度と浸漬時間を調節することによって、淡い空色から、藤色、青紫色、紺色まで染め分けることができる。

5. 安全性・堅牢度・実用性

(1) 安全性

分離細菌 *Janthinobacterium lividum* は人間、動物、植物に対して病原性があるとする報告はなく、非病原菌として扱われており、特に危険はないと思われる。

また、色素について、昆虫培養細胞への影

響を調べてみた。ヤマユガの卵巣由来の培養細胞には毒性物質に極めて感受性の高い系統がある。今回、この培養細胞に本色素の懸濁液を滴下したが、細胞は全く影響を受けず、安全性は高いものと推察された。

(2) 染色堅牢度

本色素で染色した絹について、JIS規格に基づいて堅牢度を調べた。その結果、堅牢度は草木染め程度であり、太陽光線によって退色しやすい傾向が見られた。

(3) 実用性

青紫色素は細菌の培養によって大量に得られるので、衣服類の染料として広く利用できそうである。主たる色素である violacein には抗菌活性があるとされているので、手術着などの医療面での利用も考えられる。さらに安全性が確かめられれば、化粧品や食品の方面での需要も見込まれるであろう。

なお、本研究は、著者のほか、当研究所の塚本貴敬・安居拓恵・加藤弘・早坂昭二の各氏および薬屋サイエンス・ファームの小島篤氏との共同で行われたものである。

文 献

- 1) Balows, A. et. al. (1992) *The Prokaryotes* Vol.3 : Gillis, M. and J. Deley, 2591-2600
- 2) Hoshino, T. et. al. (1988) *Bull. Fac. Agric. Niigata Univ.*, 40 : 17-33
- 3) Laatsch, H. and R. H. Thomson (1984) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2 : 1331-1339

苦味ペプチドを分解するアミノペプチダーゼ

農林水産省 食品総合研究所, *全国酪農業協同組合連合会 乳業研究所
林 清・*井澤 登

タンパク質を酵素で分解すると、呈味性や消化・吸収性が向上したり、アレルギー性が低下するなどの利点が多いが、苦味を呈することが大きな問題となっている。苦味を呈する原因は、苦味ペプチドを生ずるためであり、この苦味ペプチドをさらに分解すれば苦味は減少・消滅する。また、苦味ペプチドは疎水性アミノ酸に富むことが報告されている。そこで、疎水性アミノ酸を遊離する作用の強い酵素（細菌 *Aeromonas caviae* が生産するアミノペプチダーゼ）を見いだした。本酵素は、273残基のアミノ酸から構成され、その分子量は29,657、亜鉛を含有する金属酵素であり、反応の至適 pH は8.5、至適温度は50°Cであり、苦味ペプチド分解能に優れ、苦味を除去・低減できることを明らかにした。

1. はじめに

食生活が豊かになるに従い、食品に求められる要素は、これまでの栄養性よりも、おいしさ、安全性、体に良いといった機能性が求められつつある。とりわけ加工食品の分野では、こうした動きが顕著であり、タンパク系の素材においても、同様のことが求められている。すなわち、呈味性の向上、消化・吸収性の向上、アレルギー性の低下である¹⁾。これらは、いずれもタンパク質を構成する分子を切断し、短くすることによって達成され得るが、タンパク質を低分子化した場合には、しばしば苦味を生じ、食品素材としての価値を著しく損なうことが、問題となっている。

2. タンパク質の低分子化における問題点

タンパク質を低分子化すると呈味性が向上するが、アミノ酸にまで加水分解する場合と、呈味性は多少劣るものの豊かなコクを呈するペプチドにまで分解する場合とがある。アミノ酸にまで加水分解する方法としては、これまで酸加水分解法が行われてきたが、酸加水

分解法では強酸を使用することから、加水分解中に一部のアミノ酸が分解し、安全性の観点から好ましくない成分がわずかながら生ずる点が問題となりつつある。また、豊かなコクを呈するペプチドは、近年、麺つゆやタレ等の分野で重宝されているが、魚肉、大豆タンパク、ミルクカゼイン等を酵素分解し調製したペプチドは、しばしば苦味を呈し²⁾、商品価値を著しく損なう。

また、目を食物アレルギーに向けてみよう。3大アレルゲンといわれるものは、牛乳、大豆、卵であり、いずれもタンパク質含量の高い食品である。アレルギーの原因となっている物質（アレルゲン）も、これら食品に含まれるタンパク質である。アレルゲンとなっているタンパク質においても、そのうちのごく一部分（エピトープあるいは抗原決定基）が、その原因であり、タンパク質分子の大半は、アレルギー反応とは無関係である。そこで、エピトープの部分を適度に分解すれば、タンパク質は、もはやアレルギーの原因物質ではなくなる。既に、ミルク中に含まれるタンパク質を酵素分解した低アレルゲンミルク^{3,4)}や米に含まれるタンパク質を分解除去した低アレルゲン米などが市販されている。しかし、ここでも、タンパク質を分解した際に生じる苦味が、大きな問題となり、技術開発を妨げ

ている。

さらに、こうした食品分野ばかりでなく、医療分野で用いられる経腸液においてもペプチドが着目されている。我々は、澱粉を多量に摂取することはできても、澱粉を分解したブドウ糖となると、多量には摂取できない。これと同様に、アミノ酸の状態では多量に摂取できないが、タンパク質を大きく切断したペプチドならば効率的に摂取できることから、ペプチドが着目されているのである。ここでも、タンパク質を適度に分解したペプチドが、苦味を呈することが問題となっている。経腸液であるから、呈味性は無関係に思われるが、患者が経腸液を嘔吐した際に苦味を感じることや、経腸液を味見した際に苦味が強いとクレームが出るのである。

3. タンパク質分解による苦味ペプチドの生成

ここで、タンパク質を分解するとなぜ苦味を呈するかを考察してみよう。大豆タンパク質や、牛乳から調製したカゼイン等のタンパク質では、外側を親水性（水に溶けやすい）アミノ酸が覆い、疎水性（油に溶けやすい）アミノ酸が内側に埋もれた構造をしており、この状態では、無味である。しかし、これらのタンパク質が、加水分解されてペプチドとなったものは様々な味を示す（苦味、甘味、渋味、旨味等を呈するペプチドが存在することが、これまでに判明している。味噌、醤油、チーズ、肉などの主要な味は、タンパク質が分解されて生じたペプチドやアミノ酸の味である）。ところが、タンパク質を酵素で分解すると、これまで内側に埋もれていた疎水性アミノ酸が露出する。この疎水性アミノ酸を多く含むペプチドが、苦味を呈するのである。ペプチドを構成するアミノ酸の結合が、疎水性アミノ酸-疎水性アミノ酸、疎水性アミノ酸-塩基性アミノ酸、塩基性アミノ酸-疎水性アミノ酸と結合している場合には、苦味が強くなると言われている。しかしながら、こうした苦味ペプチドをアミノ酸にまで分解してしまうと苦味は消失する。そこで、疎水性

アミノ酸を分解する作用を有する酵素を用いれば、苦味を低減することが可能となる。

4. タンパク分解酵素の種類

一方、こうしたタンパクを切断する酵素は、タンパク質やペプチドを大きく切断するエンド型酵素と、タンパク質やペプチドの端から順にアミノ酸を遊離するエキソ型酵素とに大別される。エンド型は、至適反応pH、あるいは活性中心のアミノ酸残基をもとに、酸性プロテアーゼ（アスパラギン酸プロテアーゼ）、中性プロテアーゼ（システインプロテアーゼ）、アルカリ性プロテアーゼ（セリンプロテアーゼ）、メタロプロテアーゼに分類される。エキソ型は、ペプチドのC末端から順にアミノ酸を切り出すカルボキペプチダーゼと、N末端から順にアミノ酸を切り出すアミノペプチダーゼとに分類される。こうしたタンパク分解酵素のうち、食品加工用に市販されているものは、いずれもエンド型酵素であり、エキソ型は、極わずかに市販されている（一部エンド型が混入している）にすぎない。タンパク質の加水分解に用いる酵素を種々組み合わせたり、反応条件を工夫することにより、苦味発生を抑制しているのであるが、これといった決め手はない。そこで、農水省食品総合研究所の酵素利用研究室は、全国酪農業協同組合連合会（全酪連）の乳業開発研究所と共同研究を実施し、エキソ型の酵素を多量に生産する微生物を分離し、その酵素化学的性質並びに苦味ペプチド分解能について検討した。

5. アミノペプチダーゼの検索とその特性

ロイシン-p-ニトロアニリドの分解能を指標として（代表的な疎水性アミノ酸であるロイシンの誘導体で、このままでは無色であるが、酵素により分解されると、黄色を呈する。本物質を含む培地を用いて微生物を生育させ、コロニー周辺が黄色となったものを選択する）、酵素生産菌を検索したところ、500株あ

まりの酵素生産菌が得られた。このうちの、酵素生産性の優れた1株 (*Aeromonas caviae* と同定した) が生産する酵素の特性を解明した。まず、本菌を液体培地で培養し、得られた培養上澄を硫酸分画後、DEAE-トヨパール等の陰イオン交換カラムクロマトグラフィーおよびゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより、電気泳動的に単一の酵素標品を得、その酵素化学的性質を検討した。本菌が生産する酵素は、ペプチドをN末端のアミノ酸から順に加水分解するアミノペプチダーゼであり、ジ、トリ、テトラ等の各種のサイズのペプチドに作用した。このアミノペプチダーゼは、活性中心に亜鉛を有する金属酵素であった。酵素反応の至適 pH は8.5で、至適温度は50°Cであった。

また、本酵素の遺伝子をクローニングした結果、まず初めに、393残基のアミノ酸から構成される分子量42,228のタンパク (プレプロタンパク) として生合成された後、19残基からなるシグナルペプチドが切断され、菌体外に分子量40,285のタンパク (プロタンパク) として分泌された後、更に、101残基か

らなるN末端領域 (本酵素が活性型に折り畳まれるために必要な領域) が切断され最終的に273残基のアミノ酸から構成される分子量29,657の活性型酵素 (マチュアータンパク) となることが判明した⁵⁾。図1は、本酵素と65.3%のアミノ酸配列ホモロジーを有する *Aeromonas proteolytica* 由来のアミノペプチダーゼのX線解析に基づく結晶構造⁶⁾ から、本酵素の高次構造を Peitsch の方法により⁷⁾ 推定したものであり、本酵素は8本のヘリックスと8本の β シート構造からなるタンパク質であることが判明した。

なお、昨今のインターネットの普及により、アミノ酸配列のホモロジー検索 (インターネットアドレス; <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/homology/homology.html>)、高次構造の推定 (インターネットアドレス; <http://expasy.hcuge.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>)、パソコン上への解析画像の表示 (インターネットアドレス; <http://klaatu.oit.umass.edu:80/microbio/ras-mol/>) といった一連の作業は、無償でしかも時間の単位で解析結果が得られる。

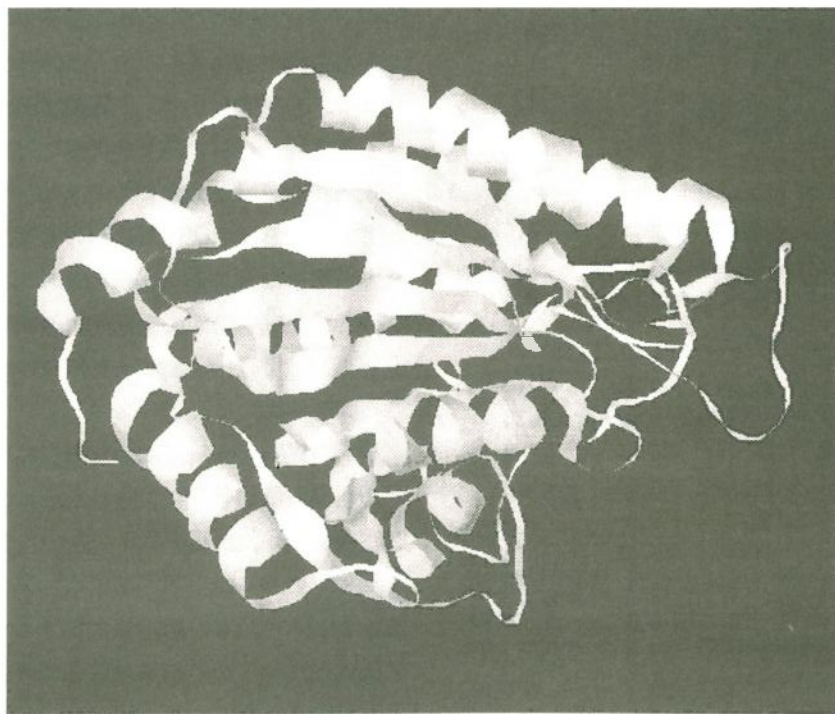


図1 アミノペプチダーゼの高次構造

本酵素は10本のヘリックス (うち8本が主要なヘリックス、図中では螺旋構造) と13本のストランド (図中ではヒモ状)、28か所のターン構造からなるタンパク質であることが判明した。

6. アミノペプチダーゼの基質特異性

ペプチドのN末端アミノ酸残基が本酵素の活性に及ぼす影響を調べるために、表1に示すような各種のジペプチド(Xaa-Phe)に対する k_{cat} , K_m を測定した (★ k_{cat} とは分子活性 (molecular activity) であり、酵素1分子が単位時間に変換する基質の分子数である。この表では、1秒間に分解する基質の分子数を表しており、この値が大きい基質ほど、酵素により分解されやすい。★ K_m とは、ミカエリス定数 (Michaelis constant) とよび酵素と基質の複合体形成反応の平衡定数をさし、酵素と基質の親和性を表す。この値が小さいほど基質への親和性が大きい。★ k_{cat}/K_m とは、酵素がどの程度作用するかを示す目安となる値であり、この値が大きいほど、酵素がよく作用する。★疎水性アミノ酸とは、ロイシン(Leu), イソロイシン(Ile), フェニルア

表1 アミノペプチダーゼの基質特異性

基 質	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$)
Leu-pNA	40.0	0.11	364
Met-pNA	9.3	0.88	11
Phe-pNA	7.8	0.71	11
Val-pNA	0.26	0.20	1.3
Ala-pNA	0.24	5.1	0.047
Lys-pNA	0.078	1.9	0.041
Arg-pNA	0.028	2.0	0.014
Gly-pNA	0.012	7.5	0.002
Pro-pNA	0.004	1.5	0.003
Glu-pNA	<0.001*		
Leu-Phe	41.0	0.05	774
Ile-Phe	3.4	0.03	136
Nva-Phe	10.3	0.45	22
Met-Phe	21.1	0.93	23
Phe-Phe	150	2.0	75
Val-Phe	1.3	0.07	18
Ala-Phe	1.1	11.7	0.09
Lys-Phe	4.2	5.0	0.84
Arg-Phe	5.3	3.8	1.4
Gly-Phe	0.01	30.1	<0.001
Pro-Phe	0.41	31.2	0.013
Ser-Phe	3.2	163	0.020
Tyr-Phe	10.8	6.6	1.7
Glu-Phe	<0.001 ^a		

ラニン(Phe), バリン(Val)であり、弱い疎水性アミノ酸は、プロリン(Pro), アラニン(Ala), スレオニン(Thr), システイン(Cys)である)。本酵素はグルタミン酸等の酸性アミノ酸残基を除くN末端アミノ酸残基を遊離した。Lue-Phe, Ile-Pheのように、N末端側に側鎖が分岐している疎水性アミノ酸が存在すると、 K_m 値が0.03~0.05mMと小さく、高い親和性を有していた。しかし、側鎖が直鎖であるNva(ノルマルバリン)に置き換わると、その K_m 値は10倍ほど上昇することから、本酵素は疎水性残基の分枝を高度に認識していることが判明した。また、Lue-PheとVal-Pheは等しい K_m を持つにも関わらず前者の k_{cat} は後者の30倍以上であることから、疎水性側鎖の長さが k_{cat} に影響を与えていることも判明した。さらに、N末端のアミノ酸をロイシンに固定した種々のジペプチドに対する k_{cat} , K_m を測定したところ、同様の傾向が認められ、N末端アミノ酸残基ばかりでなく隣接するアミノ酸残基によっても、本酵素の活性が影響されることが示された⁸⁾。

7. アミノペプチダーゼの苦味低減能

また、大豆タンパク、牛乳由来のカゼインをそれぞれペプシン、トリプシンで分解し、苦味溶液を調製した。2%のグリシルフェニルアラニンとほぼ同程度の苦味となるよう溶液を希釈した後、アミノペプチダーゼを添加し、苦味の減少の程度を官能検査法により測定した(図2)。大豆タンパク由来の苦味溶液(図2-A)に、アミノペプチダーゼをペプチドの1/8,000量添加した場合には、遊離アミノ酸の増加と共に苦味は急速に減少し、20時間後には検出限界以下となった。また、遊離したアミノ酸の76%が疎水性アミノ酸であることから、本酵素が疎水性アミノ酸を選択的に切断し、その結果、苦味が低減したことが示唆された¹⁰⁾。

しかし、ミルクカゼイン由来の苦味溶液においては、遊離アミノ酸の増加と苦味の減少が認められるが、20時間経過後においても、

苦味は検出限界以下には減少しない(図2-B, C)。酵素量を増加しても(図2-D)遊離アミノ酸の増加速度と苦味の減少速度は増加するが、苦味は一定値以下には減少しない⁹⁾。この原因は、本酵素が、苦味ペプチドのN末端側からのみ分解するためであると推察される。本酵素の作用部位とは逆側、すなわち、ペプチドのC末端側から順にアミノ酸残基を遊離するカルボキシペプチダーゼ¹¹⁾の併用が、更なる苦味の低減には有効であると考えられる。

8. おわりに

以上のように、*Aeromonas caviae*T-64が菌体外に生産するアミノペプチダーゼは、疎水性アミノ酸残基に特異性の高いエキソ型プロテアーゼであり、苦味ペプチドのN末端部位にある疎水性アミノ酸を遊離する作用が強く、人工的に作成した苦味溶液に作用させたところ、苦味が消失または低減したことから、苦味の低減能に優れていることが判明した。これまでは、チーズ製造時にタンパク分解酵素を添加することが種々試みられたが、苦味が発生し実用化には結びつかなかった。現在、この酵素を活用したチーズの熟成促進効果について検討中であり、苦味の低減化と熟成の促進に結びつくデータが得られつつある。こうしたことから、本酵素はタンパク質加水分解物中に発生する苦味の除去に有効であり、機能性ペプチドの調製、低アレルギー食品の調製、発酵食品の熟成促進などの様々な分野での応用が期待できる。

本研究は、全国農業組合連合会飼料畜産中央研究所の田野倉忠之氏、青森県水産物加工研究所 石川哲氏、リスボン製菓 太田清氏ら、多くの方々の協力を得て推進された。また、苦味ペプチド試験法に関して貴重な助言をいただいた長谷川香料(株)の牛腸忍氏、駒井強氏に感謝いたします。

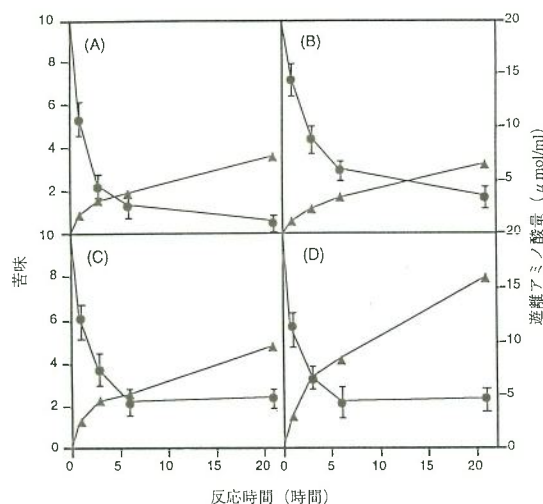


図2 アミノペプチダーゼによる苦味の減少

- : 苦味, ▲: 遊離アミノ酸
- (A) 大豆タンパク由来の苦味溶液の苦みの減少 (酵素量は基質の1/8000)
- (B) ミルクカゼイン由来の苦味溶液の苦みの減少 (酵素量は基質の1/16000)
- (C) ミルクカゼイン由来の苦味溶液の苦みの減少 (酵素量は基質の1/8000)
- (D) ミルクカゼイン由来の苦味溶液の苦みの減少 (酵素量は基質の1/4000)

文献

- 1) Skanderby M. (1994) 食品と開発, 29: 2333
- 2) 中村哲朗 ら (1991) 日食工誌, 38: 377-383
- 3) 早澤広紀 ら (1995) 食品工業, 38: 55-69
- 4) 斎藤仁志 ら (1994) フードケミカル, 1994年巻 No.7: 48-53
- 5) Izawa, N. and K. Hayashi (1996) *J. Ferment. Bioeng.*, 82: 544-548
- 6) Chevrier, B. et al. (1994) *Structure*, 2: 283
- 7) Peitsch, M. C. (1995) *Biotechnology*, 13: 658
- 8) 井澤登・林清・田淵幸一 (1996) 生物工学講要, 191
- 9) Izawa, N. and K. Hayashi (1996) *Proc. UJNR Protein Panel*, G1-G7
- 10) Izawa, N. and K. Hayashi, (1997) *J. Agric. Food Chem.* in press
- 11) Kawabata C., T. Komai and S. Gocho (1996) *Biotechnology for Improved Foods and Flavors* (Amer. Chem. Socie.), 167-172

「ネギタマ」の開発

鳥取県園芸試験場 生物工学研究室

下中雅仁

‘ネギタマ’と聞いて奇異に思われる人があるかもしれない。それもそのはず、鳥取県で作り出したネギとタマネギとの細胞融合雑種の愛称である。約二十数年前に、ドイツのメルヒャーズ博士が開発した、ジャガイモとトマトとの細胞融合雑種‘ポマト’にちなんで、私たちはこう呼んでいる。これまでに、ネギのプロトプラスト培養法や、ネギとタマネギとの細胞融合法を開発してきた結果、ようやく出来た新植物である。

1. はじめに

白ネギは鳥取県西部の砂丘地帯を中心に約800haで栽培されており、鳥取県を代表する特産野菜で、農家の栽培意欲も高い。本地帯では、古くから在来種の‘伯州ネギ’といわれる良食味の一本ネギが栽培されている。近年、ネギにおいてもF₁(エフワン)品種が種苗業者により開発され一部普及しつつあるが、県内においても在来系統を素材としたF₁品種や、耐病性品種の開発が期待されている。

当試験場では、1991年以来‘改良伯州5号’などの在来ネギ品種を素材として、タマネギの有用形質を付与することを目的とし、細胞融合技術を用いたネギの新育種技術の開発に取り組んだ。細胞融合の基礎技術となるネギのプロトプラスト培養系は、これまでに報告がなかったので、この培養系の開発を行った^{1,2,3)}。さらに、細胞融合法としては、対称細胞融合とともに非対称細胞融合に取り組み、ネギとタマネギの体細胞雑種および細胞質雑種の育成を検討した。

なお、本研究は、1991~1995年の5か年にわたり実施された農林水産省の補助事業「地域バイテク」に参画して行われた。

2. ネギプロトプラスト培養系の開発

ネギの幼植物体から単離したプロトプラストでは、細胞の分裂は観察されなかった。一方、液体培養により増殖したカルス¹⁾から単離したプロトプラストでは細胞の分裂が認められ、ネギのプロトプラストの単離と培養に際しては、カルスを材料とすることが適当であった。

ネギカルスからのプロトプラスト単離のための酵素組成としては、3%セルラーゼ・オノヅカ RS+0.5%マセロザイム R-200+0.1%ペクトリアーゼ Y-23の組合せで、酵素液中のマニトール濃度を0.6Mとすることで、 9.5×10^6 個/g・新鮮重の収量が得られた。また、フルオレセイン二酢酸(FDA)による染色では、95%以上の細胞が活性を示した^{2,3)}。

ネギプロトプラストの培養に対しては、硝酸カリウム濃度を25mMから5mMへと低減するなど、BDSオリジナル処方⁴⁾を改変することにより、細胞分裂率の向上が確認された。また、プロトプラスト培養のための植物ホルモン組成としては、 $2 \mu\text{M}$ の2,4-Dと $1 \mu\text{M}$ のベンジルアミノプリンの組合せが適当であった(図1)。その他、糖組成およびビタミン組成などを明らかにし、ネギプロトプラスト培養のための培地組成を確立した^{5,6)}。

プロトプラストからコロニーへの発達を促

SHIMONAKA Masahito

進するためには、培養後 12日まで培地の浸透圧を一定 (0.6 osm/kg) とし、その後順次浸透圧の低減を図ることが必要であった。

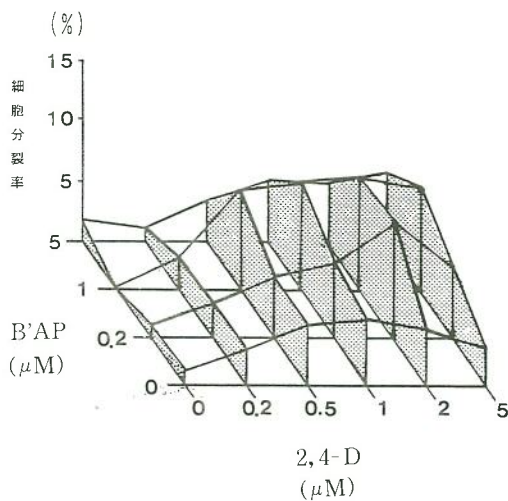


図1 各種濃度の 2, 4-D と B'AP の組合せがネギプロトプラストの細胞分裂に及ぼす効果

3. 細胞融合条件

細胞融合は、島津社製細胞融合装置 SSH-10 を用いて行った。ネギとタマネギのプロトプラストがパールチェーン (細胞が一行に接合すること) を形成するためには、カルシウム濃度として 0~0.5mM が適当であった。

ネギとタマネギの細胞を融合させるためのパルス電界強度は、1.0~1.5 kv/cm の間ではその強度が高いほど融合率も高かった。

1.5kv/cm 以上では融合率は大差はなく、電界強度が高いほど破壊される細胞が多く観察されたことから、パルス電界強度は 1.5 kv/cm が適当と考えられた。細胞密度が高

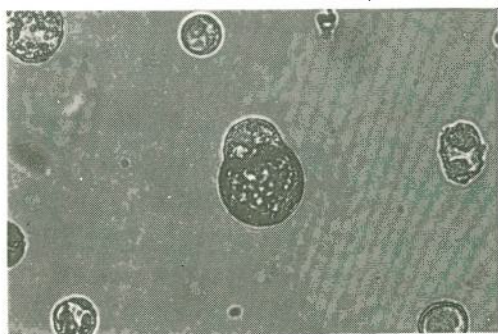


図2 ネギとタマネギの細胞融合の瞬間

いほど細胞融合率も高くなるが、ネギとタマネギが 1:1 で融合した細胞 (図 2) の頻度は、 1.5×10^5 個/ml で最高となり 7.1% であった。

4. 体細胞雑種および細胞質雑種の育成

ネギ '早どり伯州' とタマネギ 'せきほく' の対称細胞融合を行い、43 個体のコロニーが得られた。これらの 81% が 2mm 以上のカルスへと発達した。カルスを再分化培地に移植した結果、2 個体のカルスから植物体の再分化が確認された。ネギ '改良伯州 5 号' を用いた場合では、合計 27 個体のコロニーが得られた。これらの半数はカルスへと発達し、1 個体のカルスから植物体の再分化が確認された (表紙)。

一方、非対称細胞融合では、'早どり伯州' を用いた場合、56 個体のコロニーが得られた。このうちの 32 個体 (57.1%) がカルスへと発達した。これらのカルスを供試して植物体の再生を検討した結果、1 個体のカルスから植物体の再生が確認された。'改良伯州 5 号' を用いた場合では、3 個体のコロニーが得られた。2 個体のカルスから植物体の再生が確認された (表 1)。

5. 雑種性の確認

PCR-RAPD 法を用いて再分化植物体の雑種性の確認を行った結果、対称細胞融合によって得られた植物体はネギとタマネギに検出されるバンドを合わせ持っており (図 3)、この再分化植物はネギとタマネギの体細胞雑種であることが確認された。

体細胞雑種の染色体数はキメラとなっており、 $2n=16$ の 2 倍性の細胞の出現頻度が高いが、3 倍性、4 倍性、5 倍性およびこれらの異数性の細胞も観察された。

本植物を順化して、その生育特性を調査した。地上部はネギとほぼ同様の形状を示したが、鱗茎部の肥大が観察され、「ラッキョウ」様の形態となった。

表 1 対称および非対称融合細胞由来コロニーからのカルス形成および植物体の再分化

融合法	品 種 名 (ネギ×タマネギ)	コロニー 形 成 数 (a)	カルス 形 成 数* (b)	b/a (%)	植物体再生 カルス数 (c)	c/b (%)
対 称	‘早どり伯州’×‘せきほく’	43	35	81.4	2	5.7
	‘改良伯州5号’×‘せきほく’	27	16	59.3	1	6.3
非対称	‘早どり伯州’×‘せきほく’	56	32	57.1	1	3.1
	‘改良伯州5号’×‘せきほく’	3	3	100.0	2	66.6

*: コロニーをカルス形成培地にプレーティングし、3週間経過後に2mm以上に発達したカルス数をカウントした。

6. おわりに

ネギとタマネギの細胞融合技術の体系化が一応完成したものと考えられるが、個々の手法を改善しながら、さらに多くの細胞融合個体を育成し、育種素材としての諸特性を評価することが必要である。また、現在得られて

いる対称および非対称細胞融合個体について、葉緑体とミトコンドリアDNAの解析を進めている。

「ネギタマ」は、鳥取県で誕生した新しい素材として、その実用化および普及が大いに期待されており、引き続き試験を行って行きたい。

文 献

- 1) 下中雅仁・田平弘基・大村修司 (1992), 第81回日本育種学会講演要旨集, 38-39
- 2) 下中雅仁・前田英博・田平弘基・山下聡・大村修司 (1993), 第13回植物組織培養学会大会講演要旨集, 51
- 3) Shimonaka, M. (1994), Achievement of horticultural experiment station in Japan, the XXIVth International Horticultural Congress, 128-129
- 4) Dunstan D. I. and K. C. Short (1977) *Physiol. Plant.*, 41: 70-72
- 5) 下中雅仁 (1996), 平成8年度近畿中国地域における新技術, 278-283
- 6) 下中雅仁 (1996), 第90回日本育種学会講演要旨集, 160

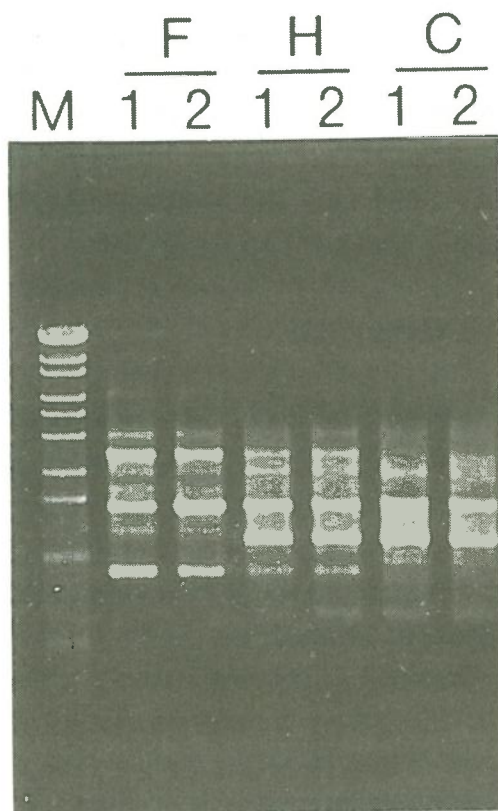


図3 PCR-PAPD法によるネギとタマネギの対称細胞融合個体の検定

プライマー: CMN-B42
 F: ネギ, C: タマネギ, H: 融合個体
 M: マーカー (λ /Sty I)
 1, 2: 別々に調製したDNAサンプル

文献情報

大腸菌におけるタンパク質分解の機構

細胞内で役目を終え不要となったタンパク質は細胞のタンパク質分解機構によって分解される。動物、植物を問わず細胞内には多くのプロテアーゼが存在することが知られているが、生体内でそれらを制御しているメカニズムについては不明な点が多い。

近年、大腸菌は生物学の研究に欠かせないものとなっているが、クローン化したDNAを大腸菌で発現した場合、遺伝子産物が不安定になる例が多く知られている。大腸菌ではタンパク質の半減期は種々の因子の組み合わせによって決まっていることから、大腸菌内で異種タンパク質を安定に保つための種々の方法が研究されている。

最近、大腸菌におけるタンパク質分解の機構について新しい知見が得られた。Keilerらは Cytochrome *b₅₆₂* および λ repressor の翻訳終止シグナルの上流に *trpA* terminator (*trpAt*) を導入し、大腸菌で発現させたところ、これら変異体タンパク質は細胞中で容易に分解された。また、C末端に Tag 配列と呼ばれる11アミノ酸 (AAN-DENYALAA) を付加したタンパク質を大腸菌で発現させると細胞内での安定性が大幅に低下した。しかし、大腸菌の tail-specific protease (Tsp) を発現しない系統 (*tsp⁻*) で同様の実験をおこなったところ、タンパク質は分解されにくいことがわかった。

trpAt 導入により翻訳終止シグナルを失った cytochrome *b₅₆₂* を *tsp⁻* 大腸菌で発現させ翻訳産物をアミノ酸シークエンスした結果、C末端には Tag 配列が付加されていることを見出した。これらの結果より、Tag 配列は Tsp によるタンパク質分解の際の標識となることが示唆された。これまでの研究では既に次のことも明らかとなっている。

Tag 配列は大腸菌の *ssrA* 遺伝子がコードする 10 Sa RNA に由来するものである。10 Sa RNA は 363 bp 程度の安定した RNA で、アラニンをチャージする t-RNA 様の性質を持つ。Tsp は大腸菌のペリプラズマおよび細胞質に存在するプロテアーゼで、Tag 配列と類似の C 末アミノ酸を認識する。

これらの事実から、筆者らは、大腸菌におけるタンパク質分解の機構の1つの例として、以下のモデル (ペプチドタグgingシステム)

ム) を示した。何らかの原因によって3' 末端部に損傷を受けた mRNA を翻訳したりリボソームは終止シグナルが欠損しているため、不完全なペプチドを合成した後、鋳型 RNA に付着したままの状態となる。アラニンをチャージした 10 Sa RNA はそのような状態にあるリボソームを認識し、不完全なポリペプチドにアラニンを付加する。その後リボソームは 10 Sa RNA を鋳型として翻訳するため、C末端に Tag 配列が付加したタンパク質が合成される。C末端に Tag 配列を持つタンパク質は Tsp により細胞内で速やかに分解される。*ssrA* および Tsp のホモログはグラム陽性、陰性を問わず、多くのバクテリアで発見されていることから、このペプチドタグgingシステムはバクテリアに共通のタンパク質分解機構であると考えられる。*ssrA* 変異株は生育遅延を起こすことから、このタンパク質分解の過程は細胞が生命活動を営む上で重要な役割を担っていると想像される。ペプチドタグgingシステムによるタンパク質分解は他の生物種にも共通したものであるのか現時点では不明であるが、今後タンパク質代謝の全体像が解明される過程で明かにされるものと思われる。

(抄訳 大野 浩一東北大農)

(OHNO Hiroshi)

Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA

Keiler, K. C., P. R. H. Waller and R.T. Sauer, *Science*, 271: 990-993 (1996)

文献情報

海洋付着生物の着生機構

フジツボやイガイなどの海洋付着生物は、船底・漁網や発電所の入水管 (海水を冷却水として利用) 等に付着して多大な損害を与えてきたため、汚損 (おぞん) 生物とも呼ばれてきた。これまでに古くはアメリカ海軍をはじめとして多くの研究機関で付着防止方法の研究が行われてきたが、主な手段である防汚塗料にしても未だに毒性の問題などがあり、根本的な解決策が無いのが現状である。科学技術庁・新技術事業団 (現科学技術振興事業団) の伏着生機構プロジェクト (1991-1996年) では、これまでに詳細な知見の少なかった海洋付着生物の着生機構について研究を行

い、興味深い成果を多数報告している。ここではフジツボに関する複数の文献について紹介してみたい。

附着生物の代表種として知られるフジツボは、幼生期をプランクトン（ノウプリウス幼生・キプリス幼生）として過ごす。キプリス幼生は、摂餌することもなしに附着する場所を探索し、やがてそれを決定するとセメント物質によって附着する。その後、変態して幼体、成体になり、成体は殻の石灰化などを伴って成長・成熟する（雌雄同体）。一度附着した後は、死ぬまで同じ場所に群居している。これらの一連の着生現象（附着・変態）がどのような機構のもとに行われているのか、これまではあまり詳細には報告されていなかった。タテジマフジツボ (*Balanus amphitrite*) の研究でキプリス幼生が摂餌しなくても附着・変態を行うことができるのはなぜか、最近明らかになった。キプリス幼生は、卵黄タンパク質の vitellin タイプのタンパク質を体内に貯蔵して様々なエネルギー源として利用しているらしく、このタンパク質は分子量約17万で、キプリス幼生期に特異的に増大し、かつ消費されるので CMP (Cypris Major Protein) と名付けられた。キプリス幼生は CMP を利用することで、摂餌せずに探索行動・附着・変態を経て幼体になることが可能であることが示唆された^{1,2)}。また、マイクロプレートにキプリス幼生を收容して、そこに様々な物質を添加する方法でキプリス幼生の行動・様子を観察する実験によって、附着・変態における情報伝達系が種々解明された。その結果、附着は神経支配で伝達物質としてセロトニンが重要な役割を果たしており、セロトニンの情報をブロックすることで附着が阻害されることが示された。また、キプリス幼生体内に調べたい物質を直接マイクロインジェクションをする方法でも同様の結果が示された³⁾。さらに同じマイクロプレート法で、TPA などのホルボールエステル類が変態のみを促進することが示され、変態における PKC (Protein Kinase C) の関与が示唆された⁴⁾。その他にホルモン物質関連では、エビやカニなどで知られる methyl farnesoate (MF) がタテジマフジツボの幼生・成体にも存在しており、幼生の変態に促進的に関与していることが示され、staurosporine・H7 などの PKC 阻害剤との実験から、MF の変態促進効果には PKC が関連していることが示唆された⁵⁾。また、タテジマフジツボよりも大型のフジツボであるアカ

フジツボ (*Megabalanus rosa*) の研究も報告された。附着の際に基盤に放出されるセメント物質が、2種類の異なるセメント細胞 α , β に蓄えられており、両細胞からエキソサイトーシスによって放出されて固化することがわかった。また、そのエキソサイトーシスは、ドーパミンなどのカテコールアミン類によって制御されていることが示唆された⁶⁾。しかしながら、セメント細胞からエキソサイトーシスにより放出されたセメント物質は、筋肉囊に一旦蓄えられてからまた別の刺激によって体外へ放出されるらしく、これらについてはまだ制御物質の特定には至っていない。

以上、フジツボ・キプリス幼生の着生機構についての複数の報告を簡単に紹介した。従来からすれば短期間にかなりの成果が示され、附着防止方法の確立にとって必要とされる生物学的な知見が多く得られている。今後の研究によって着生機構全容が解明されることを期待する。

(抄訳 山本 久一マルハ中研)

(YAMAMOTO Hisashi)

- (1) Larval storage protein of the barnacle, *Balanus amphitrite*: Biochemical and immunological similarities to vitellin, Shimizu, K. et al. (1996) *J. Exp. Zool.* 276: 87-94
- (2) Identification and partial characterization of barnacle vitellin, Shimizu, K. et al. (1996) *Comp. Biochem. Physiol.* 115(B): 111-119
- (3) Serotonin involvement in larval settlement of the barnacle, *Balanus amphitrite*, Yamamoto, H. et al. (1996) *J. Exp. Zool.* 275: 339-345
- (4) Protein kinase C (PKC) signal transduction involvement in larval metamorphosis of the barnacle, *Balanus amphitrite*, Yamamoto, H. et al. (1995) *Zool. Sci.* 12: 391-396
- (5) Methyl farnesoate induces larval metamorphosis of the barnacle, *Balanus amphitrite* via protein kinase C activation, Yamamoto, H. et al. (1995) *J. Exp. Zool.* in press
- (6) Visualization of cement exocytosis in the cypris cement gland of the barnacle *Megabalanus rosa*, Okano, K. et al. (1995) *J. Exp. Biol.* 199: 2131-2137

文献情報

初期卵胞形成にはたらく 卵子分泌因子

哺乳動物の卵子は、卵巣の卵胞内で成長・発育し、減数分裂を終了して排卵に至る。卵子の成長と機能には、卵巣で合成される成長因子が関与しているが、卵母細胞の分泌する因子と卵巣の細胞との相互作用については明らかではない。卵胞形成も、卵子内からのシグナルに影響されている可能性が示されていたが、卵子分泌因子の同定はされていなかった。Dong らは、成長分化因子-9 (GDF-9) がこの卵母細胞因子であることを初めて報告した。彼らは、GDF-9の遺伝子を欠損させたマウスを作出し、この因子の解析を行った。その結果、GDF-9欠損マウスのメスは不妊であったが、オスでは正常な生殖能を有していた。GDF-9欠損メスマウスの不妊の原因を調べるため、卵巣を形態的、組織的に検討した。

GDF-9欠損マウスの卵巣は生後1週齢で、対照区のマウスの卵巣よりすでに小さかった。GDF-9欠損マウスの卵巣内には、原始卵胞と1次卵胞が多数存在し、1次卵胞内の卵母細胞は正常な大きさで透明帯もみられたが、卵胞膜はなかった。また、黄体や正常な2次卵胞はなく、2層以上になった顆粒膜細胞は異常な細胞型であった。さらに、卵母細胞が退行し透明帯が崩れた卵胞様構造では、顆粒膜細胞は空砲化し、崩れた透明帯の内外に存在した。閉鎖卵胞がないことから、GDF-9欠損による卵胞形成阻害は、顆粒膜細胞が閉鎖に移行する前に起きている。また、GDF-9の mRNA 発現は、1次卵胞が初めて検出される時期であり、この時期にGDF-9欠損マウスの卵胞形成阻害が起きている。つまり、GDF-9の欠損は正常2次卵胞の形成を阻害し、その結果卵母細胞が退行し、卵胞の細胞が異常になる。

10-12週齢のGDF-9欠損マウスの卵母細胞では、いくらかの正常なクロマチン形成を経過するが、減数分裂はしていない。25-31週齢では、数層の扁平な顆粒膜細胞をもつ卵胞嚢腫がみられた。卵胞嚢腫ではしばしば生殖線機能亢進がみられるが、GDF-9欠損マウスでは、血中FSHとLHの濃度が、それぞれ正常型の3倍と2倍だった。一方、FSHレセプター、LHレセプターのmRNAレベルは変化しなかった。また、3週齢では、

PMSG/hCGの過排卵に反応しなかった。これらのことは、FSHとLHレセプターの下流の性腺のステロイドやペプチドによる負のフィードバックに異常が起きていることを示す。

GDF-9遺伝子の重要性が示されたことで、ヒトの初期卵胞発育における遺伝性不妊症の解明に応用できる可能性がある。また、今まで説明のできなかつた不妊の解明や新しい避妊法の開発に、有用な情報となることが期待されている。今後、卵胞発育に対する卵母細胞由来因子の同定が盛んになるだろう。

(抄訳 松本浩道—東北大農)

(MATSUMOTO Hiromichi)

The vocabulary of the egg

Gosden, R.

Nature, 383: 485, 10 October, 1996

Growth differentiation factor - 9 is required during early ovarian folliculogenesis

Dong, J., D.F Albertini, K. Nishimori, T. R. Kumar, N. Lu and M.M. Matzuk

Nature, 383: 531, 10 October, 1996

文献情報

吟醸酒の薫り 酢酸エステル合成キー 酵素のトピックス

近年、日本酒の品質の高級化、スタイルの多様化にともない、吟醸酒が店先に多く見受けられるようになってきた。吟醸酒は精米度の高い原料米を使い、低温で静かに発酵させる特徴的な醸造法が用いられる。その熟成のイメージが商品に高級感を与えているとも言えるが、これらの発酵条件には科学的な理由がある事が明らかにされつつある。

吟醸酒の品質を決定する大きな要因に「吟醸香」がある。その香気成分は複雑で多彩であるが、主要成分の一群である酢酸エステル類は酵母の持つアルコールアセチルトランスフェラーゼ(AATase)の働きによってアセチルCoAと様々なアルコールから作られる。この酵素活性は高温と好氣的環境に不安定であり、不飽和脂肪酸の存在により強く阻害を受ける。また本酵素の産物の一つである酢酸イソアミルはイソアミルアルコールとアセチルCoAから合成されるが、このイソアミルアルコールはロイシン合成経路の中間生成物であり、この経路はロイシンによるフィード

バック阻害の調節を受けている。これらの知見は吟醸酒醸造における原料米の高精米度と低温静置発酵を科学的に説明するものである。

このような香気生成に深く関わる AATase は、その遺伝子 *ATF1* がクローニングされており、多コピーで導入した形質転換体は酢酸イソアミルと酢酸エチルの両エステルを野生株に比べて高濃度に合成した。このことから AATase が単独で二つのエステルの両方を合成している可能性が示唆されるが、生化学的な解析からは *ATF1* タンパク質 (Atf1p) 以外の AATase の存在が示唆されている。本文献では *ATF1* 遺伝子を遺伝子工学的に破壊し、その変異株の各エステル合成能を測定することで、Atf1p 以外の AATase 酵素の性質を検討している。

ATF1 遺伝子を含む DNA 断片は pUC19 にクローニングされ、その遺伝子の開始コドン ATG から 10bp 下流の *ClaI* サイトで切断し直線化された。この断片を BAL31ヌクレアーゼで末端から緩やかに分解し、その後 *URA3* 遺伝子と結合させて環状に戻した。この結果、*ATF1* 遺伝子は N 末端側約 1.0 kbp が欠失したことになる。*ura3-52* の遺伝子型を持つ半数体 TD4 株をこの環状 DNA で形質転換し、*URA⁺* をマーカーに、完全に *ATF1* 遺伝子の破壊された *atf1*-null 変異株をスクリーニングした。この *atf1*-null 変異株は *ATF1* 遺伝子の mRNA を発現していないことが確認されている。この株を静置培養すると、経時的にエタノール、イソアミルアルコールが TD4 株と同程度に合成されるが、酢酸エチルの量は 2/3 に、酢酸イソアミル量は 1/15 にそれぞれ減少していた。弱いながらも各エステルの合成活性が認められることから、Atf1p 以外の AATase 活性の存在が明らかになった。この活性の部分精製を試みたところ、酢酸エチルを合成する EATase 活性と酢酸イソアミルを合成する IATase 活性が Mono P カラムによって別のピークに分離し、それぞれが別のタンパク質である事が示唆された。また、Atf1p の活性に比較してそれぞれの活性は温度安定性がやや高く、好気環境における阻害も受けないことが示された。

永い歴史を持った発酵食品は経験的に発酵条件が設定されていった部分が多く、すべての条件設定が科学的裏付けができていないわけではない。しかし今回の香気生成機構のようにすっきりとした説明がなされるものも存在する。今回の報告では酢酸エステルを合成す

る酵素 Atf1p が、アルコールに対して弱いながらも基質特異性を示すこと、またその欠損株において別な酵素が酢酸エステルを合成する事を明らかにした。香気成分は酢酸エステルだけではなく、それぞれが対応する酵素活性によって合成されている事は間違いなく、今回のように複数の経路で合成されるものもあるだろう。そうした香気生成のメカニズムが全て明らかになったとき、その人為的なコントロールによって自由自在に香りのバランスを変えた酒類が店先に並ぶようになるかもしれない。そのとき、「吟醸」とは何なのか、「高級酒」とはどういうものなのか、その価値観を見つめなおすべきかもしれない。

(抄訳 篠田 直一カルピス食品)

(SHINODA Tadashi)

Acetate ester production by *Saccharomyces cerevisiae* lacking the *ATF1* gene encoding the alcohol acetyltransferase

Fujii, T., H. Yoshimoto and Y. Tamai
J. Ferment. Bioeng., 81: 538-542 (1996)

文献情報

雌性不稔と交配型が糸状菌の sexual/asexual の構成割合と進化に及ぼす効果

子の菌綱 Ascomycetes に属する糸状菌は、通常半数体 haploid の菌糸で存在し、分生子形成や菌糸伸長により栄養繁殖 (無性生殖) vegetative propagation を繰り返すが、条件が整うと、交配して有性生殖 sexual reproduction に移行する。ところが、一部の菌は、有性生殖が未知かその能力を欠いており asexual, 不完全菌綱 Fungi Imperfecti に分類される。(興味深いことに、植物病原菌や産業に利用されている菌には、このような不完全菌が多い、訳者注。) 最近の研究 (Lobuglio, *et al.*, *Mycologia*, 84: 592-604, 1993; Geiser, *et al.*, *Fungal Genet. Newsl.*, 42A: 65, 1995; Burt, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 770-773, 1996) で、複数の不完全菌について、進化的に近縁に位置すると考えられる有性世代形成能を有する糸状菌が発見されたことにより、この両者の関係を解析することで、糸状菌がどのように進化してきたかを探る糸口となることが期待される。そこで、理想的な姿と考えられる、自己不稔 self-sterile で両性 her-

maphrodite なヘテロタリック heterothallic で栄養繁殖および有性生殖の両方の増殖能を持つ菌が、有性生殖を行わない asexual な菌の祖先であったと考え、asexual な菌が何故優勢になり得たかについて数学的なアプローチで解析を試みた。

両性の菌と、そのゲノム上の1箇所に変異が起きて雌性不稔 (female sterile, すなわち子実体 fruiting body を形成できない) になった菌が存在する集団をモデルとして考察する。全体に占める両性の菌の割合を h ($0 < h \leq 1$) とすると、 n 回の交配の後の両性の菌の割合は $h_n = (1 + h_{n-1})/2$ で表され、交配を繰り返すほどその割合は大きくなる。なぜなら、雌性不稔な菌は、両性の菌と交配した場合にのみ子孫を作れるからである。たとえ、ここで、雌性不稔な菌が、両性である菌よりも雄としての能力が高いと仮定しても、両性である菌の雄としての能力が0 (すなわち、雄性不稔 male sterile ということであるが、実際にはこのような菌は存在しない) でない限りは両性の菌の割合は増加し続ける。これは、両性の菌の、雌性不稔な菌と比較した雄としての能力を m ($0 \leq m \leq 1$) で表したときに、 n 世代後の両性の菌の割合が $h_n = (1 + mh_{n-1})/2$ で表されるからである。さらに、雌性不稔の原因としてゲノム上の数か所での変異が起きたと仮定しても、交配を重ねると必ず両性の菌が多勢となる。つまり、ここまでの結果は、交配は両性の菌に有利に働き、雌性不稔に不利であるため、集団の中で asexual な菌が優勢となり得ないことを示している。

ところが、先にも触れたように、多くの菌は栄養繁殖を行うことができ、条件が整った場合に有性生殖に移行する。生活環における栄養繁殖で増殖する割合を、雌性不稔な菌で X_f s、両性の菌で X_h と表すと、栄養繁殖における両性の菌の優位性は X_h/X_f s で示すことができるが、この値が1を超えることはないと考えれば、1サイクルの生活環の中で栄養繁殖の回数 n' が多ければ多いほど両性の菌の割合 (X_h/X_f s) ^{n'} は減少していく。 $X_h=0$ の時には両性の菌は栄養繁殖しないことを意味するから、有性生殖が必要な環境条件になるまで雄性不稔な菌が増え続けることになる。このように、栄養繁殖を繰り返す環境が継続すれば、長年の内に両性の菌の割合が極限まで0に近づき、雌性不稔の菌ばかりで構成されるようになり、asexual な菌の集団ができる。

現実には、有性世代の形成には、交配型遺伝子により決定される2つの交配型の菌が必要とされるため、その存在比等のさらに複数の係数が存在する。

菌の増殖方式として、通常は有性生殖か栄養繁殖のどちらかのみが要求されているわけではなく、両者とも長時間軸で種を増やし維持するのに有効であるから、環境に応じて両増殖法がとられる。そのため、多くの菌は両性のものと雌性不稔のものにより構成される。しかし、環境や菌の特性として、ときに有性生殖あるいは栄養繁殖により適合したものが出現すると、構成の割合が極端に振れることがある。その例が、好ましくない条件下で厚膜胞子や菌核を作り栄養繁殖で長期に生存できる菌や寄生植物上などの一定の環境下で栄養繁殖により世代交代ができるグループの菌であり、asexual な菌が優勢になり得た原因が示唆されたのである。

(抄訳 有江 力一理研)

(ARIE Tsutomu)

Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi

Leslie, J. F. and K. K. Klein

Genetics, 144: 557-567 (1996)

文献情報

植物の病害抵抗性遺伝子を単離する—PCR法の適用

過去数年間にわたって、様々な植物からウイルス、細菌、糸状菌といった幅広い病原体に対する抵抗性遺伝子を単離したという報告が続いている。抵抗性遺伝子の単離は、それが直接抵抗性作物の育種に結びつくだけでなく、植物がどのようにして病原体の攻撃から身を守っているかという、最も基礎的な知見を得るためにも重要な研究である。これまで知られている抵抗性遺伝子は、主にアラビドプシスやタバコ、トマト、イネのような、いわゆるモデル植物を材料とし、トランスポゾンタギングや遺伝子歩行といった技術を用いて単離されている。しかし、そのような植物もしくは技術を利用できない場合にはどうしたらよいのか? 本稿で紹介する論文では、その解決に1つの光を投げかけている。

抵抗性遺伝子として単離された遺伝子の翻訳産物には、ロイシンリッチリピートやスクレオチド結合部位 (NBS) といった共通の

保存領域が存在していることが知られている。Leisterらは、この保存領域に着目し、そのアミノ酸配列を基にした degenerate primer を用いてジャガイモのゲノム DNA を鋳型とする PCR を行った。彼らが設計したプライマーは、アラビドプシスの *Pseudomonas* 抵抗性遺伝子 *RPS2* とタバコのタバコモザイクウイルス (TMV) 抵抗性遺伝子 *N* の NBS のうち両者のアミノ酸配列が完全に一致する kinase 1-a モチーフをターゲットとするもので、*RPS2* および *N* では約160アミノ酸の領域をコードしている。3通りのプライマーの組み合わせで行った PCR の結果、それぞれの組み合わせで複数の DNA 断片が増幅された。このうち、プライマーペア II を用いて得られた DNA は、RFLP マッピングのプロープとしたところ高度の繰り返し配列とハイブリダイズしたことからその後の解析から除外された。プライマーペア I により増幅された DNA は360~800bp の大きさで、そのうち800 (1.1), 360 (1.3) bp の断片は均一な DNA であったが500bp の断片は5種類の配列のヘテロな集団であった。またプライマーペア III による PCR 産物は、400~1100bp の大きさの4種類で、1100 (3.1), 750 (3.2), 400 (3.4) bp の断片はホモの集団であったが、500 (3.3) bp の断片は6種類の配列による混合物であった。得られた PCR 産物の幾つかの塩基配列を決定したところ、*RPS2* や *N* だけでなく、アラビドプシスの *RPM1* やアマの *L6* といった遺伝子に対しても相同性が認められ、塩基配列をアミノ酸に翻訳した状態での相同性は43~82%であった。またそれらのアミノ酸配列をアラインメント解析すると、*RPS2* や *N* と同じように NBS の kinase 2 や kinase 3a モチーフの存在が確認された。

得られた PCR 産物が、実際に病害抵抗性と関連があるのかどうかを調べるために、それらの産物をプロープとして RFLP マッピングが行われた。ジャガイモの染色体地図上にはセンチウからウイルスに至る様々な病原体に対する抵抗性遺伝子座が既にマップされている。PCR 産物3.3の1つ、3.3.2をプロープとした場合、ジャガイモの染色体Ⅷ上に *St3.3.2* という遺伝子座を同定することができた。興味深いことに、この位置には既にセンチウ抵抗性遺伝子 *Gro1* がマップされており、両者の連鎖関係が注目された。そこで彼らは1100個体ものジャガイモを用いて、*St3.3.2* 領域の高密度マッピングを行ったと

ころ、*Gro1* 遺伝子座を挟む2つの RFLP マーカーと *St3.3.2* の間に組換えを検出できなかった。1100個体中で1個体の組換えが生じた場合、その組換え価は0.1%となるが、*Gro1* 遺伝子座近傍での1%の組換え価は100 kb に相当する。すなわち、*Gro1* と *St3.3.2* の間の距離は10kb 以下と予想されること、また *RPS2* や *N* のゲノムクローンは6~8 kb の大きさであることを考えると、3.3.2が *Gro1* の一部である可能性が極めて高いと判断された。

その他にも、1.2.1がマップされた染色体 XI の領域には疫病菌に対する抵抗性遺伝子の1つ *R7* がマップされており、この場合は96個体の集団中で両者の間に組換えが生じなかったことが述べられている。またトマトの TMV 抵抗性遺伝子 *Tm-1* や *N* 遺伝子等のジャガイモのホモログ遺伝子座と同じ遺伝子座にマップされたものが合計で5マーカー得られた。さらにトマトの *Pseudomonas* 抵抗性遺伝子である *Pto* や *Cladosporium* 抵抗性遺伝子 *Cf9* の配列を基にした PCR によって得られた産物が、既知のジャガイモ染色体上の遺伝子座と密接に連鎖していることも明らかとなった。以上の結果から、本法によって実際に抵抗性遺伝子を単離することができる可能性が極めて高いと判断された。

得られた PCR 産物を含むゲノム DNA クローンを用いた感受性品種の形質転換を行うまでは、厳密にはそれが抵抗性遺伝子の一部であることを証明したとは言えない。しかしながら、本論文で述べられた結果は、これまで未知であった様々な植物の抵抗性遺伝子を単離する大きな手がかりになるであろうと予想される。特に遺伝学的な解析があまり行われていない植物を材料としている研究者にとっては、大きな福音となるであろう。

(同様なアプローチがダイズでも行われている。参照、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11746-11750, 11751-11756, 1996)

(抄訳 柄澤 明—東北大農)

(KARASAWA Akira)

A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants

Leister D., A. Ballvora, F. Salamini and C. Gebhardt

Nature Genet., 14: 421-429 (1996)

海外便り

線虫のプログラム細胞死の研究

—ウィスコンシン大学マジソン校でのポストク生活—

東京大学大学院理学系研究科

杉本 亜砂子

1. はじめに

私は1992年5月から1996年3月まで、ポストドクトラルフェローとして米国ウィスコンシン大学マジソン校の Joel H. Rothman 博士の研究室で線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いたプログラム細胞死の研究を行った。異国の地で新しい分野に挑戦するということが出発前には不安もあったが、終わってみれば研究面で得るところが多かっただけでなく、日本とアメリカの大学の研究環境やサイエンスの方法論の違いについてもいろいろ考えさせられることが多い4年間だった。

2. マジソン—線虫 *C. elegans* 研究の 中心的存在

マジソンは米国ウィスコンシン州の州都で、人口約20万人の大学町である。冬が厳しいこと（ -20°C 以下になることも多い…それも慣れてしまうのであるが）を除けば、治安もよく、学生のエネルギーに溢れた過ごしやすい町であった。実際、雑誌等で発表される「アメリカで住みやすい町」で毎年上位に選ばれている。町は2つの湖で挟まれており、大学は大きい方の Lake Mendota に沿って延々と東西にのびている。広大なキャンパスに4万人を超える学部学生を擁するマンモス大学である。もともと酪農が盛んな土地柄のため農学部から発展していった大学で、現在では生物・医学・畜産等生物関係一般に強く、生命科学関係の教授陣だけで800人という生物系では全米一の規模を誇る大学である。

私がウィスコンシン大学を留学先として選

んだのは、線虫 *C. elegans* 研究の中心的存在だからである。*C. elegans* は30年ほど前に S. Brenner が当時発展してきていた分子生物学・分子遺伝学的手法を用いて動物の行動を研究するためモデル系として使い始め、現在では発生研究には欠かせない実験系としての地位が確立されている。ウィスコンシン大学マジソン校には Judith Kimble, Phil Anderson, John White という *C. elegans* 研究の大御所の研究室を始め、私の受け入れ先の Joel Rothman, 若手の Jeff Hardin の研究室があり、活発に研究が行われている。一つのキャンパスにこれだけレベルの高い線虫の研究室が集まっている場所は他にない。2年に一度の *C. elegans* の国際学会もマジソンで開かれるのが通例となっており、1995年の学会には約700人の *C. elegans* 研究者が集まった。

私が研究室に入ったのは Joel H. Rothman 博士は独立してまだ8か月という時期で、私は彼のポストク第1号であった。研究室のメンバーはテクニシャンが1人、大学院生が4人と最初は少なかったが、上述のように線虫研究者はキャンパス内に数十人はいるので、討論相手には事欠かなかった。日本から留学する場合には Big Lab を選ぶ人が多いと思うが、小規模な研究室はボスと直接討論する機会が多く、研究テーマの選択・進め方の自由度が高いという利点がある。ボスとの距離が近いということで、実験だけでなく研究費の申請書の書き方や研究室の運営についてなどについても学ぶことができ、よい経験になった。

SUGIMOTO Asako

3. 研究内容—線虫のプログラム細胞死

Rothman は *C. elegans* の発生過程全般に興味を持っており、胚発生に異常のある突然変異体の検索・解析を中心に行っている。私は発生過程で自然に起きる細胞の死、すなわちプログラム細胞死の分子機構の研究を行うことになった。

C. elegans はプログラム細胞死の研究に適した性質を持っている。まず、細胞数が成虫で約1000と少なく、細胞系譜がすべて明らかにされている。受精卵が成虫にいたるまでに正確に131個の細胞がプログラム細胞死で除去される。卵殻・細胞が透明なため、発生過程の観察が容易である。プログラム細胞死で死んだ細胞は微分干渉顕微鏡で観察すると平らなボタンのように見える。プログラム細胞死をライブで観察できるというのは他の系にはない大きな特徴である。また、*C. elegans* は突然変異体を分離し遺伝学的手法を用いて解析できる。これまで主に Bob Horvitz (MIT) の研究室が中心となってプログラム細胞死の遺伝学的経路が明らかにされていた。

私の最初の細胞死に関するプロジェクトは、同じキャンパスのウイルス学者、Paul Friesen 博士のセミナーを聞いたことから始まった。彼は昆虫を宿主とするバキュロウイルスを専門とし、このウイルスが持つ p35 という因子が、ウイルス感染によって誘導された宿主細胞のアポトーシスを抑制する機構について研究していた。セミナー後に彼と立ち話をしているうちに、線虫で p35 を発現させたらどうなるだろうか試してみようと言うことになり、即、共同研究をすることになった。共同研究がこんなに簡単に成立してしまうのも、アメリカのだと思ったものである。

私は p35 を *C. elegans* の胚発生期に強制発現させ、通常起こるはずのプログラム細胞死が抑制されることを示した²⁾。この結果は、バキュロウイルスの宿主である昆虫と線虫 *C. elegans* の細胞死の分子機構には共通の機構が働いており p35 はその中心的な因子に作

用して細胞死を抑制していることを示唆するものである。その後、p35 は多様な哺乳動物細胞のアポトーシスを抑制できることが報告され、普遍的な細胞死抑制因子として注目されるようになった。最近になって、2つのグループにより p35 は、細胞死の実行に中心的な役割を果たす ICE (Interleukin 1 β converting enzyme) 様プロテアーゼのインヒビターであることが示された^{3,4)}。

その後、私は *C. elegans* の新しい細胞死関連遺伝子の検索を始めた。手法としては他の生物で同定された細胞死関連遺伝子の *C. elegans* ホモログの同定・解析⁵⁾と、染色体欠失のコレクションを利用した新しい細胞死関連遺伝子の遺伝学的な検索を行った。これらのプロジェクトは、帰国後も Rothman と共同で継続中である。プログラム細胞死を遺伝学的に解析できる系は *C. elegans* 以外にはあまりないので、今後も *C. elegans* の特徴を生かした研究を続け、プログラム細胞死の分子機構の解明に携わっていきたいと考えている。

4. アメリカの大学の研究室

アメリカの大学と日本の大学の研究環境はかなり雰囲気が異なっている。国民性・文化の差ということもあるが、見習うべき点もあると思うので気がついた点をいくつか述べてみたい。

まず、分業化が進んでいて、研究者は研究のみに専念することができるようになってきていることである。Rothman 研究室では、線虫を飼うためのプレート作りや洗い物は学部学生をアルバイトとして雇っていた(アメリカの学部学生は普通研究室に配属されない)。線虫株の維持・物品の注文はテクニシャンが一手に引き受けていた。また、学部全体のスライド作りや写真現像を請け負う Media Lab があり、学会前や論文投稿の際にはお世話になった。日本の大学では技官のポストは削られる一方であり、実験補助員を雇うこともままならず、研究とは言いがたい仕事に

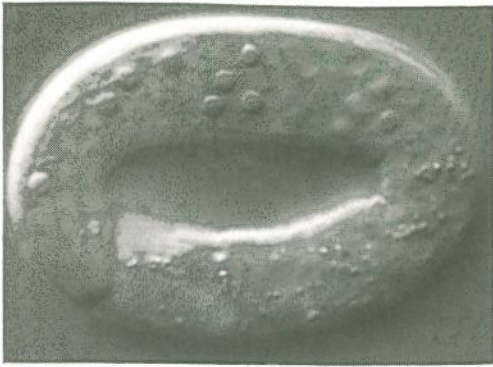


図 線虫 *C. elegans* の胚
ノマルスキー顕微鏡で観察したもの。死んだ細胞は平らなボタンのように見える。

かなりの時間を割かねばならないのが現状である。最近日本ではポストドク1万人計画が基礎研究分野の改革の柱のひとつとしてうたわれているが、研究者を増やすと同時に研究補助のシステムももっと検討されるべきではないだろうか。

第二に、アメリカの研究者はネットワークづくりが上手である。アメリカの研究者は一般に議論好き、討論好きで、研究者同士の情報・意見交換が盛んである。私はこのネットワークこそがアメリカのサイエンスの活性の源だと思っている。例えば、ウィスコンシン大学では研究室や学部の枠を越えた交流がたいへん盛んであった。私に関わっていたものだけでも、キャンパス中の線虫研究者が集まる Big Group Meeting、細胞死・アポトーシスの研究者の集まりである Cell Death Study Group、発生生物学者の集団の Developmental Biology Study Group などがあつた。これらのミーティングを通して、同じ実験系を使っている研究者や同じ生命現象に興味を持つ研究者と最新の情報を交換し、専門家の助言を得ることができる。違う分野の研究者と討論すると新たな視点からものを

見ることができ、新たなアイデアが生まれることも往々にしてある。

最後に、アメリカで羨ましく思ったのが、教授であろうが入りたての学生であろうがファーストネームで呼び合って討論できることである。自己主張できるように育てるというアメリカの教育システムのためもあるが、とにかく研究室に入ったら誰もが研究者として平等だという概念が成立していた。新入生が教授に対して「それは間違っていると思う」と言え、教授が若い学生の意見に素直に耳を傾ける、という雰囲気は討論を活発にし、結果として研究室全体が活性化されていたように思う。

帰国してみて、日本の基礎科学の研究費が4年前と比較してかなり増えていることに驚いた。多くの先進国で研究費が削られている中で、いまや羨望される存在である。先進機器を揃えている研究室も数多く見受けられる。しかし、旧式の機器を使いながらも素晴らしい研究をしているアメリカの研究室を思い起こすと、科学の活性化には研究費を増やすだけでよいのだろうかと考え込んでしまうのである。

参考文献

- 1) Clem, R. J. *et al.* (1991) *Science*, 254: 1388-1390
- 2) Sugimoto, A. *et al.* (1994) *EMBO J.*, 13: 2023-2028
- 3) Bump, N. J., *et al.* (1995) *Science*, 269: 1885-1888
- 4) Xue, D. and H. R. Horvitz, (1995) *Nature*, 377: 248-251
- 5) Sugimoto, A. *et al.* (1995) *ENBO, J.*, 14: 4434-4441

特別情報

バイオ関連発明の明細書の記載について

弁 理 士
渡邊睦雄

1. はじめに

平成7年7月1日から改正特許法が施行されているが、この改正の主な狙いは、特許制度の国際的ハーモナイゼーションを図り、独創的な研究に基づく成果を広く保護することであった。これに伴って、近年技術進歩の目覚ましい、バイオ技術、微生物、植物、動物等の生物関連発明については、更に特有な判断、取り扱いが必要であることから、特許庁は、明細書の記載要件、新規性、進歩性などの特許要件の審査の運用指針案を示して、どのような発明が特許されるか、明細書はどのように記載すればよいかについて、従来の審査運用指針では判断が困難であった事柄についても説明している。近く確定版が作成される予定である。

ここでは、この運用指針案で取り扱う、遺伝子、ベクター、組換えベクター、形質転換体、融合細胞、組換えタンパク質、モノクローナル抗体等の遺伝子工学に関する発明の明細書の記載要件の改定について説明する。

2. 特許請求の範囲の記載

従来、遺伝子工学により生産されるタンパク質やこれをコードするDNAの発明は、タンパク質の性質だけで発明を特定することは不十分であるなどの理由で、アミノ酸配列や塩基配列で具体的に特定することが要求されていた。そのため、生物学的性質に影響を与えない重要でない一部の配列を改変したものは、侵害が否定されてしまうことになりかね

WATANABE Mutsuo

なかった。そこで、実質的に同一の機能を有する、アミノ酸の一部が欠失、置換もしくは付加された類縁体やアレル変異体を含め広く保護することを認めるよう要請されていた。

新しい運用指針案では、遺伝子工学により生産されるタンパク質等を、機能・製法等により又は配列とともに特定することで、一層の保護を拡大することを可能にし、パイオニア発明は従来より広くクレームできるようにした。したがって、後発の模倣的な開発は難しくなるので、企業の開発能力の一層の強化が迫られるようになるだろう。一方で、権利を抽象的な表現で認めることは、本来の技術思想を越えた範囲まで権利に含んでしまう可能性があるため、クレームに記載した発明は、実施可能であると共に、明確、簡潔に記載されていなければならない。

新しい運用指針案では、遺伝子工学の発明のクレームは、例えば次のように記載することができる。

(1) 遺伝子

①遺伝子は、塩基配列により、又は当該遺伝子によってコードされたタンパク質のアミノ酸配列により特定して記載することができる。

例：Met-Asp-…Lys-Glu で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子。

②遺伝子のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が「欠失、置換もしくは付加された」等の表現及び当該遺伝子の機能、更に必要に応じて起源・由来等を組み合わせる包括的な記載をすることができる。

例：以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) Met-Asp-…Lys-Glu で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつA酵素活性を有するタンパク質
(注：詳細な説明において、アミノ酸の欠失、置換、付加の程度について説明する必要がある)

例：以下の(a)又は(b)のDNAからなる遺伝子。

(a) ATGTATCGG…TGCCT の塩基配列からなるDNA

(b)(a)の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつB酵素活性を有するタンパク質をコードするヒト由来のDNA

(注：詳細な説明において、ストリンジントな条件について説明する必要がある)

③遺伝子は、その機能、理化学的性質、起源・由来、製法等により特定して記載することができる。

(2) ベクター、組換えベクター

ベクターは、DNA塩基配列、開裂地図、分子量、塩基対数、採取源、製法、その機能、性質等により特定して記載することができる。組換えベクターは、遺伝子とベクターの少なくとも一方を特定して記載することができる。

例：ACAGCA…AGTCAC の塩基配列である遺伝子を含有する組換えベクター。

(3) 形質転換体

形質転換体は、宿主及び導入遺伝子又は組換えベクターの少なくとも一方を特定して記載することができる。

(4) 融合細胞

融合細胞は、使用した親細胞、融合細胞の機能・性質、融合細胞の製法等により特定して記載することができる。

(5) 組換えタンパク質

アミノ酸配列又は該アミノ酸配列をコード

する構造遺伝子の塩基配列により特定して記載することができる。

(6) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、モノクローナル抗体が認識する抗原、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、交差反応性等により特定して記載することができる。

例：抗原Aに対するモノクローナル抗体。

(注：抗原Aは物質として特定して記載されている必要がある)

例：ATCC HB-○○○○であるハイブリドーマにより産生される、抗原Aに対するモノクローナル抗体。

例：抗原Aに反応し、抗原Bに反応しないモノクローナル抗体。

3. 発明の詳細な説明

クレームした発明は実施可能でなければならず、詳細な説明の項には、当業者がその物を作ることができ、かつその物を使用することができるように、明確かつ十分に記載されていなければならない。例えば、実際に取得された遺伝子に対し著しく相同性が低い遺伝子を含み、かつ機能により特定されている場合、実際に取得された遺伝子と同一の機能を有するものを選択することは容易でないので、このような場合は、そのものを作ることができるように記載されていないことになる。

(1) 遺伝子、ベクター又は組換えベクター

これらの製造方法としては、各々の起源・由来、使用するベクター等の入手手段、使用酵素、処理条件、採取・精製工程、確認手段等を記載する。

(2) 形質転換体

導入される遺伝子又は組換えベクター、宿主、遺伝子の導入方法、組換えベクターの導入方法、形質転換体の選択採取方法、確認手段等を記載する。

(3) 融合細胞

融合細胞予備処理、融合条件、融合細胞の選択採取方法、確認手段等を記載する。

(4) 組換えタンパク質

組換えタンパク質をコードする遺伝子発現に使用するベクター・宿主等への導入方法、該遺伝子を導入した形質転換体からの組換えタンパク質の採取・精製工程、組換えタンパク質の確認手段等を記載する。

(5) モノクローナル抗体

免疫原の入手・製造手段、免疫方法、抗体産生細胞の選択採取方法、モノクローナル抗体の確認手段等を記載する。

(6) 微生物等の寄託

微生物等から製造される遺伝子、ベクター、組換えベクター、形質転換体、融合細胞、組換えタンパク質、モノクローナル抗体等の発明においては、当該物を当業者が製造できるよう、その製造方法を出願当初の明細書に記載するとともに、それらの製造のために使用する微生物等を当業者が容易に入手することができる場合を除いて、その微生物等（製造された遺伝子・ベクター・組換えベクターが導入された形質転換体、融合細胞を含む）を寄託し、その寄託番号を出願当初の明細書に記載する。

4. おわりに

明細書の記載要件と関連して、クレーム解

釈の問題として、国際調和を踏まえた均等論の適用のあり方が問題になっている。昨年大阪高裁は、組換えヒト組織プラスミノゲン活性化因子（tPA）のアミノ酸配列のうち、245位のバリン残基がメチオニン残基に置換されているという点で相違するが、その余のアミノ酸残基およびクレームに記載の5つの特性において差がない、met-tPAはval-tPAの均等物であると判決した。このように、tPAのバリンからメチオニンへの置換が可能であり、tPAの機能に影響を与えない部位であることが知られている245位に、バリンと置換しやすくしかも機能に影響を与えないことが予測されるメチオニンで置換することは容易であるので、均等と認められ侵害とされたのである。

しかし、このようなクレーム解釈に頼ることなく、前記改訂運用指針案のように、特許請求の範囲を広く記載することが認められれば、独創的な発明が厚く保護されることになり、望ましいことである。

編集後記

BRAIN テクノニュースは本号で還暦を迎えることができました。これは、ひとえに購読者、執筆者ならびに関係の皆様のご理解とご支援によるものと心からお礼申し上げます。

昭和62年の創刊号から、当協会は生研機構の委託を受けて編集・発送等の業務を行っています。創刊当時バイテクは次世代を拓く革新技术として期待され、社会の関心も高く購読会員も順調に増えました。しかし、バブルの崩壊とともに企業では具体的成果を求めるようになり、研究活動も一時停滞し、購読会員も減りました。しかし、海外ではバイテク研究は着実に進み、昨年末からは組換えダイズやナタネなどがアメリカ、カナダから入っ

て来ることになりました。わが国でも大きな試練を経て、ここ数年バイテク研究は地道な発展の兆が見え、会員数も漸増しています。

購読会員数は時代の変化とともに増減しますが、本誌としましては、常にその時々読者の期待に応えるホットな情報を提供したいと考えています。そのためには、先端研究の動向に目を配ることはもちろんですが、読者の皆様の要望を的確にとらえることが何よりも重要かと思えます。

還暦を期に新たな気持ちで取り組みたいと考えていますので、本誌に対するご意見、ご要望等を積極的にお寄せいただきますよう、よろしくお願いいたします。(大畑記)

ブレインテクノニュース (第60号)

平成9年3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