

A 2

WT

アンチセンス Ntlim 1 遺伝子を導入したタバコ (左) 及び、タバコの茎の断面図 (右)。CAD 遺伝子の発現が抑制されたアンチセンス Ntlim 1 遺伝子導入タバコ (A 2) は、野生株 (WT) に比較して、茎の赤色化が見られる。  
(本文16ページ参照)

## 総 説

野尻秀昭・羽部 浩・大森俊雄

バイオレメディエーションと細菌によるダイオキシン分解…………… 1

## 国内情報

軽部征夫・野村陽子

内分泌攪乱物質のバイオセンシング…………… 5

金原和秀

微生物による PCB の分解とトータル処理への応用…………… 8

畔上耕児

発光遺伝子を用いた植物病原細菌の生態学的研究……………13

河岡明義・海老沼宏安

転写因子によるリグニン生合成の抑制……………16

## 地域の先端研究

今村嘉博・志和将一

水生植物を利用した茶園排水の浄化とリサイクル化……………19

## 文献情報

マウス精子における fertilin  $\beta$  の役割……………23

*Lactobacillus acidophilus* の酸および胆汁酸耐性株の分離とその性質……………23

コムギ実生を急速に冷却することによる生長速度と茎のサイトカイニン含量の急激な変動……………24

長いままでは毒，切り刻めば葉？

——ヘパリンオリゴ糖がアルツハイマー病治療薬になる可能性がある——……………25

## 海外便り

北本宏子

酵母細胞骨格制御機構に関する分子生物学的研究

——フランス細胞分子生物学研究所での1年間——……………27

## 特別情報

小林康弘

バイオテクノロジー産業の創造に向けた基本方針について……………30

総説

## バイオレメディエーションと細菌による ダイオキシン分解

東京大学 生物生産工学研究センター

野尻秀昭・羽部 浩・大森俊雄

微生物の多様な分解能力を利用し環境中の汚染物質を分解浄化することをバイオレメディエーションと呼ぶ。Land farming, bioventing, biofilterといったバイオレメディエーション技術が原油汚染などの修復に既に適用されているが、ダイオキシンによる土壤汚染は広範囲・低濃度であり未だ修復技術は確立されていない。そこで、ダイオキシン分解菌である *Pseudomonas* sp. CA10 株のダイオキシン分解能について評価を行った。

### 1. はじめに

現在、世界中で生産されている化合物は10万種を越えるが、環境中に放出された場合の消長と人体に対する影響がよく理解されている化合物は約100種にすぎない。また、廃棄物の燃焼等の二次的なプロセスにおいて生成・放出される物質も存在するため、自然界に放出される全物質を把握するのは不可能である。近年、ダイオキシンや内分泌攪乱化学物質による自然環境の汚染が、多くのマスコミ報道により社会的注目を集めるようになったが、日本ではいまだにそれらの毒性評価や汚染実態調査を行っている段階であり、今後研究の進展によっては新規毒性の発見や規制の強化が予想される。

これらの環境汚染物質が自然界に放出されると、光化学反応等の非酵素的な変換を受けるが、完全分解されることはまれである。一方、放出された環境汚染物質は生分解により無機化される。生分解の主体となる微生物は、生理的に驚くべき多様性を示し、極めて広範囲の化学物質を分解・無機化することができる。この微生物の多様な分解能力を上手にコントロールし環境中の汚染物質を分解浄化することを、環境の生物的修復(バイオレメディエーション)と呼ぶ。

本総説では、バイオレメディエーションに  
NOJIRI Hideaki, HABA Hiroshi, OMORI Toshio

について概説した後、筆者らが行っているダイオキシン汚染土壤のバイオレメディエーション法の開発に向けた研究を紹介する。

### 2. バイオレメディエーション

微生物は様々な化合物に対して分解活性を有しているが、その分解速度は自然のままの状態では遅い場合が多い。バイオレメディエーションは、このような遅い生分解速度を何らかの手段を講じることによって速め、汚染物質を検出限界以下、あるいは規制値以下の安全な濃度にまで速やかに減少させることを目的とする。現在、土壤、地下水、スラッジ、生活・工業排水、ガス等に含まれる汚染物質の分解に、その分解対象物質・現場環境に応じた様々なバイオレメディエーション技術が用いられている。

有機物による土壤の重篤な汚染(原油汚染等)は、汚染箇所における炭素過多の状態ととらえることができ、微生物の成育にとって必須な窒素・リン・酸素(土壤表層の場合を除く)の不足を引き起こす。Land farmingやbed reactorでは、土壤に栄養塩や酸素・水分を与えて土壤が本来持つ汚染物質分解力を強化する。この様に、栄養源を土壤に添加し微生物の成育を助けることをbiostimulationと呼ぶ。また、汚染土壤にわら、木片等の易分解性の固形有機物を混ぜ込み処理する技術がcompostingであるが、この場合は同時に

biostimulationを行うことが多い。酸素等の供給の方法として、土壌に通した管から強制的に吸引を行い揮発性汚染成分を抽出するとともに、引圧となった土壌に空気（酸素）や栄養源を供給して分解力増強を行う bioventing も行われている。一方、疎水性の高さなどの原因によって汚染物質の土壌への吸着が問題となる場合には、汚染土壌を反応槽内で液体と混合し適当な界面活性剤や分散剤を加えて処理を行う slurry-phase treatment が行われる。上記の様な常在微生物を利用する方法では分解力を十分高められない場合には、その物質の強力な分解菌を反応系内に添加し分解力を強化する方法 (bioaugmentation) を行うことも可能である。

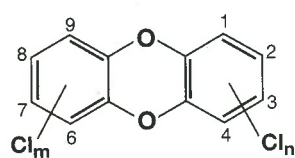
一方、地下水汚染の *in situ*での汚染除去を目的として、栄養物や酸素を地下水に注入して地下水中の常在微生物により汚染物質分解を行う方法 (biorestration) が開発されている。

ガス中の悪臭成分の除去には、コンポスト、活性炭、多孔質ガラス等の表面に分解性微生物を育成させ、それに原因物質を含むガスを通すことで除去を行う biofilter も実用化されている。

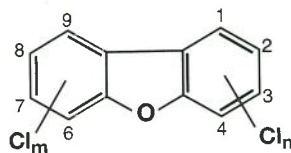
さらに、多糖類、活性炭、ポリウレタン、ポリアクリルアミド等を用いて分解菌を固定化したカラムに処理水を通過させ、処理水に含まれる汚染物質を分解する方法 (immobilized cells) も実用化されている。

上記のような手法を用いて分解活性を十分高めることが可能であっても、さらにその手法を汚染除去に適用するためには、以下に示すような条件を満たす必要がある。

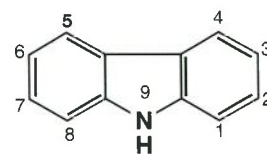
- ①微生物が分解の過程で毒物を蓄積しないこと。



Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin



Polychlorinated dibenzofuran



Carbazole

図1 ダイオキシン類と carbazole の化学構造

- ②混在する化合物や代謝中間体によって分解反応が阻害されないこと。

- ③他の手段による処理技術よりバイオレメディエーションの方が低コストなこと。

ある汚染の修復にどの技術が最適なのかは、汚染の原因物質と現場環境により大きく異なるため、現在は処理方法が経験的に決められているのが実状である。従って、trichloroethylene (TCE) や原油による汚染など発生箇所も多く汚染修復の経験が蓄積している物質についてはある程度手法が最適化されている。しかしながら他の物質による汚染については、今後それに最適化されたバイオレメディエーション技術を開発していく必要がある。特に、ダイオキシン汚染等は広範囲かつ低濃度の汚染であり、汚染処理法の開発には従来の技術に加えて新しい技術の開発が必要不可欠である。

### 3. *Pseudomonas* sp. CA10 株によるダイオキシン分解

ダイオキシンは dibenzo-*p*-dioxin (DD) の塩素置換体 (図1) の総称で、類似した構造と活性を有する化合物として polychlorinated dibenzofuran (図1) がある。両者とも最大8個までの塩素をベンゼン環に置換基として有することができるため、各々75種、135種の異性体が存在する。

現在までに、ダイオキシンのモデル化合物である dibenzofuran (DBF) や DD を唯一の炭素源・エネルギー源として生育できる細菌が集積培養法によりスクリーニングされている。これらの資化菌の DBF や DD の分解経路に関する研究から、報告されている細菌の多くが類似の分解経路によって分解を行っていることが明らかになった (図2)。この分解代

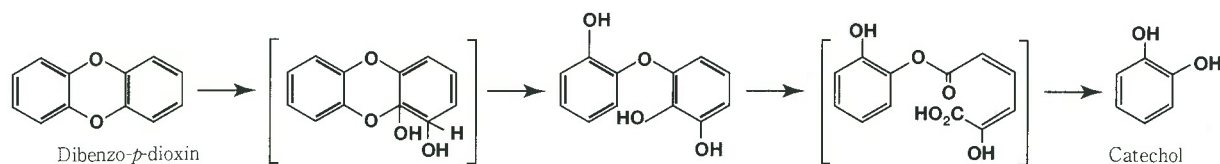


図2 *Sphingomonas* sp. strain RW 1株のDD分解経路

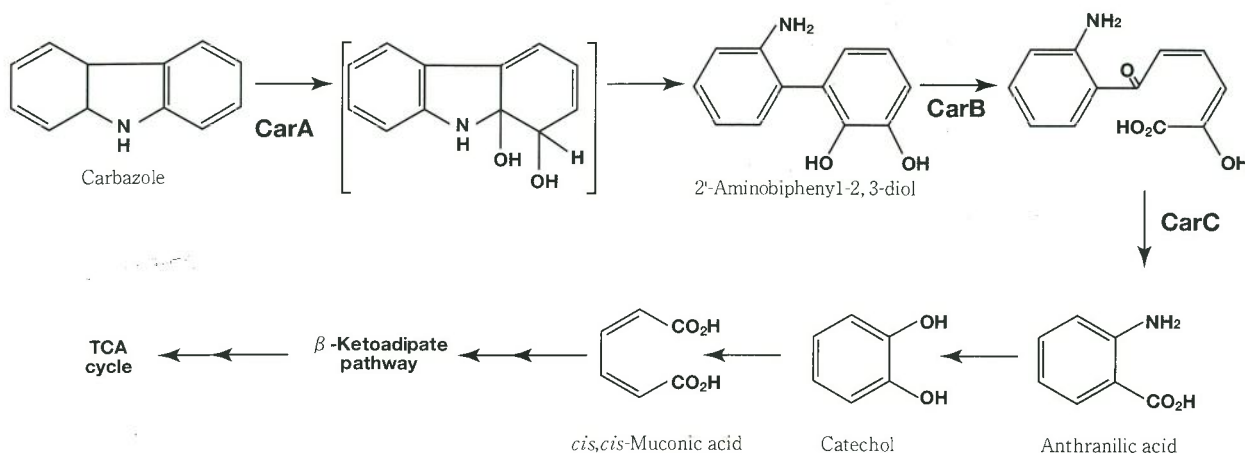


図3 *Pseudomonas* sp. CA10株のcarbazole分解経路

謝系の特徴として初発酸化反応があげられる。この反応は、酸素原子と結合している炭素原子とそれに隣接する炭素原子に分子状酸素の酸素原子を一個ずつ導入する反応で、angular dioxygenation (核間への酸素添加反応)と呼ばれる。この反応により、DD (DBF) は不安定なヘミアセタール中間体となり、自発的な環開裂と再芳香環化により 2,2',3-trihydroxydiphenyl ether (2,2',3-trihydroxybiphenyl) へと変換される。したがって、一段階の反応によりダイオキシンの高い毒性の所以となっている分子の平面構造が破壊されるため、angular dioxygenation はダイオキシンの無毒化を考える上で非常に重要な反応とすることができる。

ところで、我々の研究グループにおいてDBFやDDの構造類縁体であるcarbazoleの資化菌 *Pseudomonas* sp. CA10株が活性汚泥より単離された。<sup>1)</sup> CA10株は図3に示すようにDBFやDDと非常に類似した経路でcarbazoleを分解代謝することが明らかになり、その代謝を担う酵素がダイオキシン分解菌のダイオキシン類の代謝を担う酵素と isofunctional な酵素であることが推察された。実際、CA10株からクローニングされたcarbazole初発酸化酵

素 CarA は、carbazole に対するのと全く同様にDBFやDDに対して angular dioxygenation を触媒することができる。<sup>2),3)</sup> さらに、CarA がダイオキシン類の中でも最強の毒性を有する2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinに対しても酸化活性を有することも示され、CA10株がダイオキシン汚染のバイオレメディエーションに利用できる可能性が示された。そこで、*in vitro*でのCarAのダイオキシン分解活性を定量的に評価するため、CarAを高発現する大腸菌を用いた約16時間の休止菌体反応を行ったところ、10 ppm のモデル基質 (2,3-dichlorodibenzo-*p*-dioxin) が50%程度分解されることが明らかになった。しかし、反応系に土壌を添加した slurry reactor モデルでは、休止菌体反応と同様の条件で5日間反応させてもモデル基質は25%程度しか減少しなかった。この結果は、ダイオキシンの分解が土壌の存在により阻害されることを示しており、土壌粒子への吸着などが原因と推測される。上記の実験で用いたモデル基質濃度は10 ppm (10 μg/g soil) であり、実際にダイオキシン汚染が問題となっている土壌中の各ダイオキシン異性体濃度と比較すると10<sup>3</sup>以上の高濃度である。したがって、実際のダイオキシン

## 4 総説

汚染土のCA10株等を用いたバイオレメディエーションを行う場合においては、土壌への吸着が非常に大きな問題となることが予想される。

今後は、CA10株をはじめとする微生物のダイオキシン分解能を実際の汚染濃度のダイオキシンに対して発揮させられる様なシステムの開発とが重要と考えられる。また、より高い分解能を有する微生物の取得と育種や、closed systemにおける汚染土壌処理での利用を念頭とした遺伝子工学によるダイオキシン分解能の強化を行っていく必要がある。

### 参考文献

1. Ouchiyama, N, et al (1993), Biodegradation of carbazole by *Pseudomonas* spp. CA06 and CA10, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, p455-460
2. Sato, S, et al (1997), Identification and characterization of genes encoding carbazole 1, 9a-dioxygenase in *Pseudomonas* sp. strain CA10, *J. Bacteriol.*, 179, p4850-4858
3. Nojiri, H, et al (1999), Diverse oxygenations catalyzed by carbazole 1, 9a-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain CA10, *J. Bacteriol.*, in press

## 国内情報

## 内分泌攪乱物質のバイオセンシング

東京大学先端科学技術研究センター

軽部 征夫・野村 陽子

## 1. 外因性内分泌攪乱物質

外因性内分泌攪乱物質（環境ホルモン）とは、生物の内分泌系に影響を及ぼす有害化学物質である。ダイオキシン類やPCB（ポリ塩化ビフェニール）、農薬、ビスフェノールAなどが例として挙げられ、とりわけダイオキシン類は大きな社会問題にもなっている。これらの外因性内分泌攪乱物質は環境庁で確認されているものだけで約70種類である。

ダイオキシン類は日本で最も注目されている外因性内分泌攪乱物質の1つである。ダイオキシン類は極めて高い毒性を持つだけでなく、ゴミの焼却処理によって、非意図的に生成され続け汚染が広がった。このため、各種規制が行われるようになり、飛灰だけでなく、土壌、排水、食物など多様かつ膨大な数の試料のダイオキシン濃度の測定が現在必要とされている。

## 2. 外因性内分泌攪乱物質とその測定

外因性内分泌攪乱物質は、一般的には、GC-MS法などの機器分析によって計測される。しかし、外因性内分泌攪乱物質は通常、実試料には微量にしか含まれない。このため、熟練した技術を伴う試料の前処理を要し、処理後の試料がGC-MSで分析される。この方法は、正確である一方で、コストや測定時間に問題がある。したがって、抗原抗体反応などの生物化学的な分析方法が、GC-MS法のプレスクリーニング用簡易測定法として開発された。この簡易測定法は、抗原抗体反応を応用した

KARUBE Isao, NOMURA Yoko

キットが汎用されている。

例えば、ダイオキシン類やPCB類について簡易測定法はHarisson等（1997）により提案されており、このような抗原抗体反応を用いたキットはすでに数種市販されている。しかし、この方法も通常は手分析で行われ、測定には1～2時間以上を要する。さらに、この方法も十分に安価とはいえない。

すなわち、ダイオキシン類など内分泌攪乱物質に対する従来法は、プレスクリーニング用に開発されたものでさえいくつかの問題が残る。このため、本研究ではバイオセンサーによる外因性内分泌攪乱物質の検出を試みた。

## 3. バイオセンサー（軽部, 1989）

バイオセンサーとは、生体分子の優れた分子識別機能とトランスデューサーを組み合わせた測定法である（図1）。バイオセンサーでは、素子である生体分子と測定対象物の反応に伴う物質濃度の変化を、トランスデューサーにより電気信号として表す。バイオセンサーには、単純かつ簡便に迅速な測定が可能であり、低コストであるなどの利点がある。これに加えて、ダイオキシン類などの毒物検出にこれが応用される場合には、安全な測定が期待される。

分子識別に用いる生体材料として、従来の酵素や抗体、微生物に加えて最近ではDNAやRNAなども応用されるようになった。トランスデューサーとしてはおもに電極などが使われていたが、近年、表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance, SPR）の原理を用いた検出装置（河田, 1989; 橋本, 1997）も応用されている。これは、高感度な生体分子

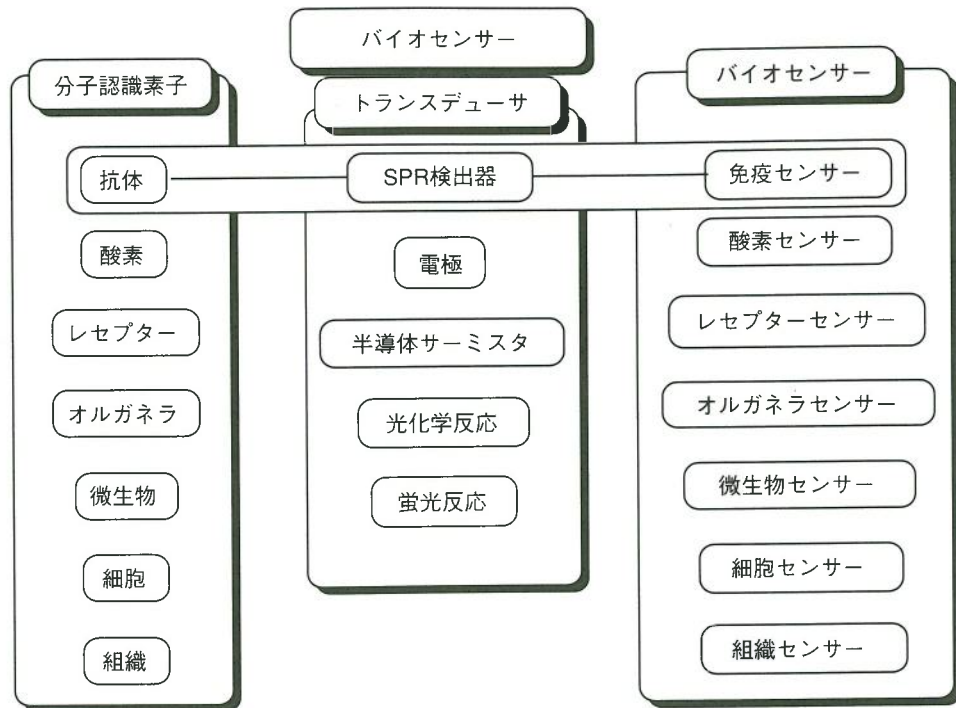


図1 バイオセンサー

相互作用検出用に開発された高感度な装置であり、バイオセンサーのトランスデューサーとしては最適である。さらに、SPR検出装置は、通常はフロー型の装置であることからリアルタイムに物質の結合を検出することができる。

SPRによる測定では、生体分子（例えば抗体）がセンサーチップ上に固定化され、これに作用する分子（抗原あるいはその標識物）を含む試料をセンサーチップ上に流すと、2分子の結合の状態がSPRのシグナルとして検出される。

#### 4. バイオセンサーによる外因性内分泌攪乱物質の測定

本研究室ではかねてから、SPRに抗原抗体反応、特に競合法を用いることで農薬などの外因性内分泌攪乱物質の測定を行ってきた。SPR検出装置では分子量の大きいものの結合や解離は検出しやすい。すなわち、分子量数100の外因性内分泌攪乱物質そのものよりも、分子量数万のタンパク質などの方が検出しやすい。したがって、タンパク質を外因性内分泌攪乱物質に標識し、これを測定に用いることで、SPRのシグナルは増幅し高感度な検出

が期待される。

競合法（図2）では、この性質を利用して、直接目的とする物質を測るのではなく、目的物質と競合的に抗体に結合する物質を測ることにより間接的に目的物質を計測する方法である。ここで、外因性内分泌攪乱物質も標識された外因性内分泌攪乱物質も抗体に結合することから、目的の物質の濃度の上昇に伴い応答値は減少していく。標識物としてはホースラディッシュペロオキシダーゼ(HRP)や、ウシ血清アルブミンなどが一般的に用いられる。

市販のダイオキシン類や農薬など外因性内分泌攪乱物質の抗体をSPR検出装置(BIAcore 2000, 株式会社ビアコア, 東京)内の金薄膜チップに固定化する。固定化はアミノカップリング法で行い、チップ上の未反応活性部位はエタノールアミンでブロックした。このようにして得られたチップに、タンパク質で標識された外因性内分泌攪乱物質と外因性内分泌攪乱物質の混合溶液を流した。標識された外因性内分泌攪乱物質の量を一定にしておき、外因性内分泌攪乱物質の濃度を変化させたところ、例えばアトラジン（農薬）では、図3に示すように、センサーの応答値は外因性内分泌攪乱物質の濃度に依存した。



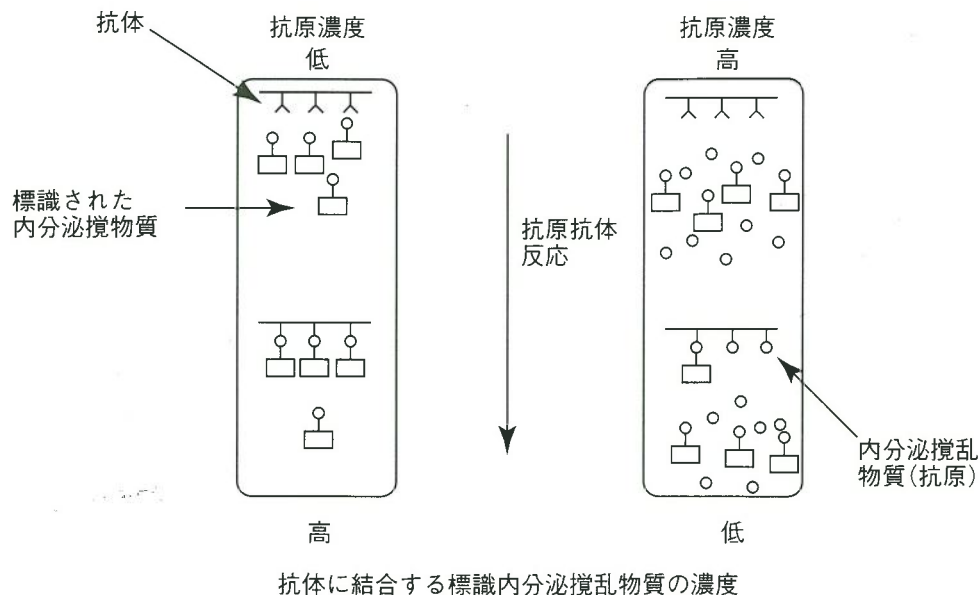


図2 競合法

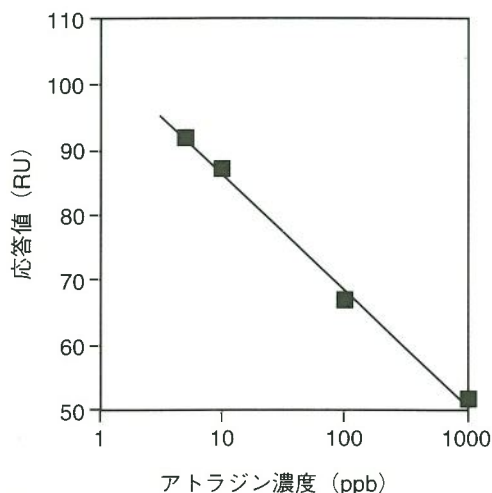


図3 センサー値 (RU) の農薬 (アトラジン) 濃度依存性

アトラジンの測定に関して、本センサー法による高感度な検出が可能であったことから、次に、この方法をダイオキシン類のなかでも最も毒性の高い2,3,7,8-TCDD検出へ応用した。この場合も同様に数10ppbのダイオキシンの検出が可能であると示唆された。アトラジン、ダイオキシン類いずれの場合も測定時間は約20分間であり、従来の簡易測定法と比較しても1/5以下に短縮した。また、この測定では、インジェクション時の試料も数μL程度しか必要とされず、すべてオンラインで行うことができ、安全性も高い。

### 5. まとめ

ダイオキシンなど外因性内分泌攪乱物質問題の早急な解決が望まれる。バイオセンサー法は、特にそのプレスクリーニングを安全、簡便、迅速に行うことができる優れた方法の1つである。今後、特にダイオキシン類計測への応用を目的として、高感度化や実試料測定などの検討を進めていきたい。

### 謝辞

本研究は株式会社荏原製作所の協力を得て進められました。ここに感謝いたします。

### 参考文献

軽部征夫 (1989) 「バイオセンサー」 共立出版  
 河田聡 (1989) 「表面プラズモンセンサー」 O plus E, 112, 133-139.  
 坂井るり子, 大迫政浩, 吉田幸弘, 芳賀直樹, 岩島清, 田中勝 (1997) 「酵素免疫測定法によるダイオキシン類のスクリーニングに関する研究」 廃棄物学会論文誌, 8 (7), 311-320.  
 根本せつ子 (1997) 「表面プラズモン共鳴現象を利用する生体分子相互作用の解析」 ぶんせき, 5, 362-368.  
 Harrison, R. O., Carlson, R. E. (1997) An immunoassay for TEQ screening of dioxin/furan samples: Current status of assay and applications development, Chemosphere, 34(5-7), 915-928.

## 国内情報

## 微生物による PCB の分解とトータル処理への応用

財団法人鉄道総合技術研究所 環境生物学研究室

金原 和秀

PCBは、土壌、水、大気とあらゆる環境を汚染している有機塩素化合物である。微生物はPCBを代謝することができるが、塩素置換数の多い異性体の分解は困難である。そこで、紫外線照射による脱塩素反応と組み合わせたPCBオイル処理の研究を行い、実処理の可能性を切り開いた。また、PCBのトータル処理をめざして、PCB汚染した土壌、ヘドロ、水の処理に関する基礎研究を行い、微生物を用いたPCB汚染除去の可能性を示した。

## 1. はじめに

ポリ塩化ビフェニル (Polychlorinated biphenyl, PCB) は、ビフェニルに、鉄粉を触媒として塩素を付加することで簡単に合成できる有機塩素化合物の一種である。塩素が結びつく位置は2から6, 2'から6'の10個あり、そこにランダムに塩素が結びつくため、異性体と呼ばれる多くの類似した化合物ができる。ガスクロマトグラフで分析すると、100種類以上のPCBのピークがみられ様々な異性体の混合物であることがわかる。化学的に非常に安定で、電気絶縁性に優れているため、コンデンサや変圧器の絶縁油、熱媒体、機械油など多くの用途に使用された。

PCBの環境汚染に関しては、1966年にはじめて指摘され、地球規模で環境を汚染していることが問題となった。日本では1968年に熱媒体として使用していたPCBが食用米ぬか油中に混入して人々が食べ、いわゆるカネミ油症事件が起きPCBの人体に対する影響が問題となった。そして、1972年に製造が中止され、1974年に使用が制限されて今日に至る。日本では約5万8千トンのPCBが生産され、そのうち5万3千トンが使用された。約7千トンはメーカーによって回収されたが、未回収のPCBは使用者により保管されている。

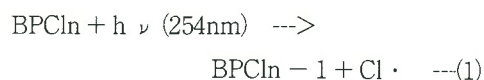
KIMBARA Kazuhide

## 2. PCBをなくすには

PCBは塩素が付加した油状物質であるため、燃焼分解することができる。この方法は経済的かつ簡便であると考えられていたが、低温(200~700℃)で燃焼した場合、毒性のけた違いに高いジベンゾフランやダイオキシンが生成することがわかり、1,100℃以上の高温で完全に燃焼させるなど燃焼法の改良が試みられた<sup>1)2)</sup>。しかし、分析技術の進歩に伴いごみ焼却場などからダイオキシンが検出されるようになり、燃焼による処分に対しては住民の抵抗が大きいのが現状である。また、PCBは土壌、水、大気とあらゆる環境から検出される環境汚染物質でもある。環境中のPCBを分解するには微生物や植物の能力を利用する方法があり、我々もバイオレメディエーションを目指した研究を進めている。これに関しては本誌第68号に寄稿している。ここでは、それらの研究の基礎となる微生物を用いたPCB処理に関する研究の現状を述べる。有機塩素化合物を分解する微生物は数多く見つかったが、塩素置換数の多い化合物を代謝する微生物はなかなか見つからない<sup>3)</sup>。これは今でも世界各地ならびに魚や母乳などから検出されるPCBが一般的に塩素置換数の多い異性体であることと一致している<sup>4)</sup>。我々は微生物の代謝能を用いてPCBを処理する研究を開始したが、塩素置換数の多いPCBを直

接微生物で分解するのは困難であるため、紫外線照射による脱塩素と組み合わせるといった方法を考えた。

紫外線照射による脱塩素反応は以下の通りである。PCBのアルコール溶液は紫外線領域に吸収スペクトルを持ち、237nm付近に吸収極大を持つ。従ってPCBに紫外線を照射するとPCBが紫外線を吸収、励起し光分解を生じる。



PCBラジカルと塩素ラジカルはともにアルコール分子から水素を引き抜きアルコールラ

ジカルを生成する。よって以後の反応はアルコールラジカルをキャリアーとして進行する<sup>5)</sup>。この場合、最終生成物（ビフェニル、アセトン）の電子捕捉による反応阻害が同時に進行する。従って、PCBの脱塩素反応を完全に進行させることは難しいが、産物である塩素置換数が低下したPCBは微生物の代謝により分解可能である。

### 3. PCB分解の基礎試験

我々の考案した分解方法の有効性を調べるため、試験管レベルの培養液を用いて実験し

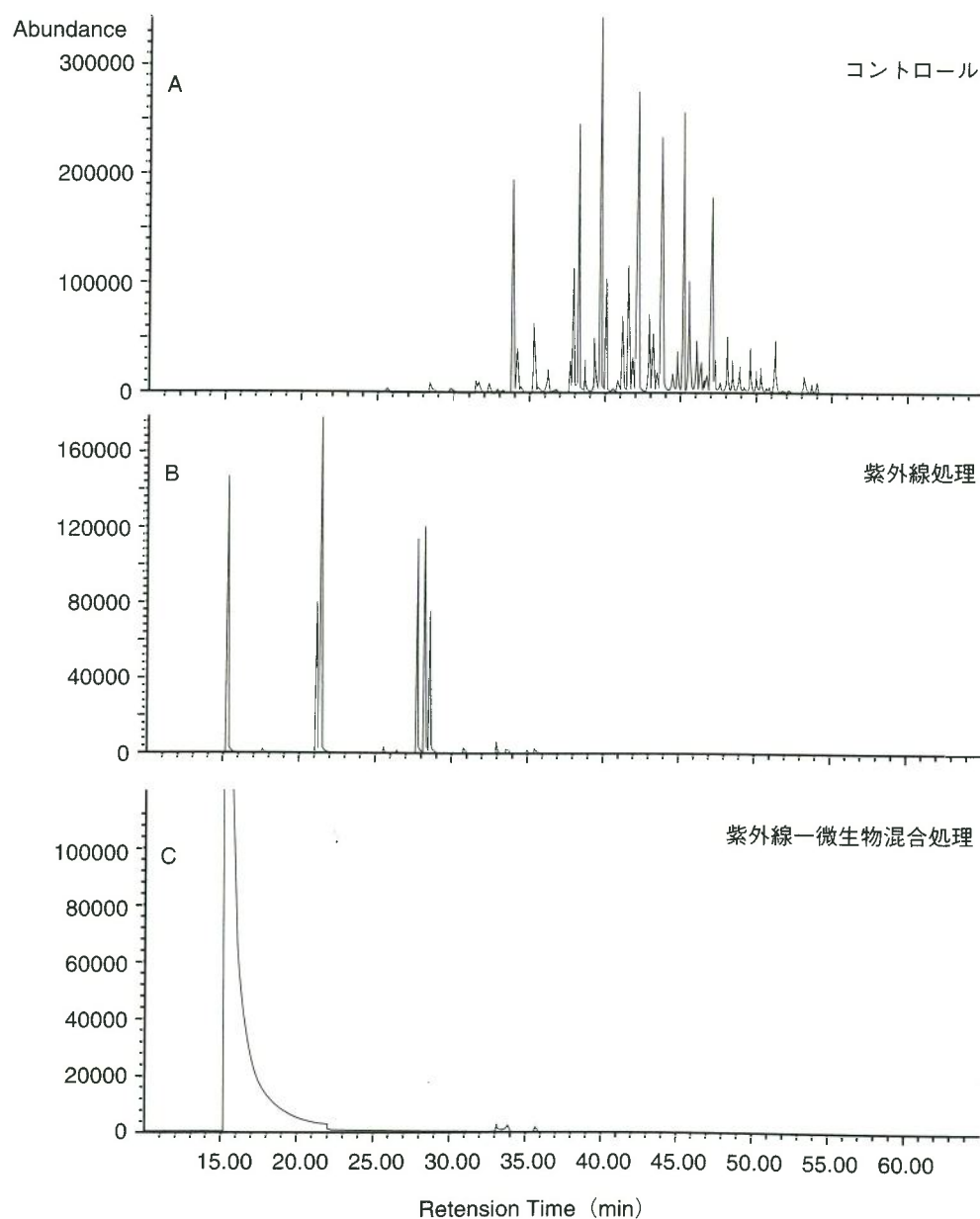


図1 紫外線-微生物混合処理による Kaneclor 500 の分解

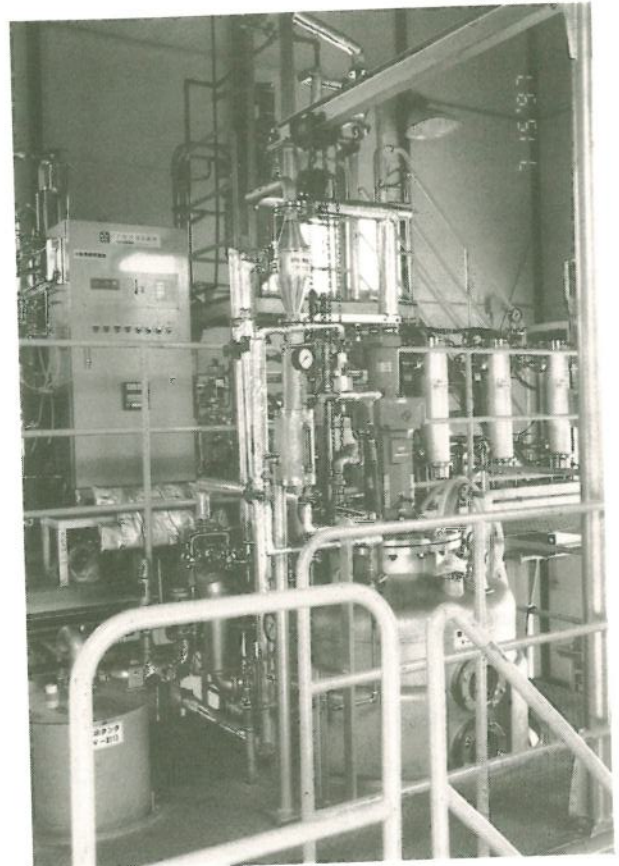
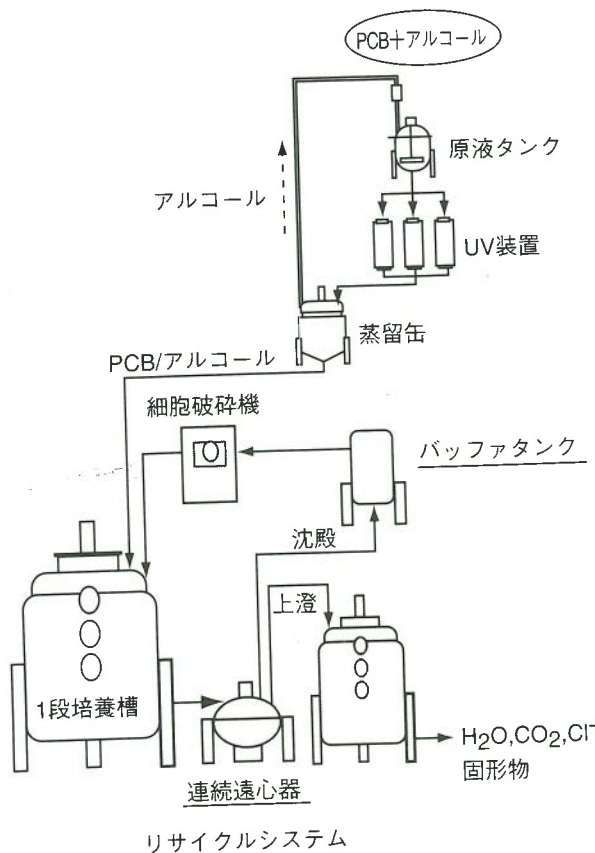


図2 パイロットプラントの概要

た結果を述べる<sup>6)</sup>。ここで用いた紫外線照射装置は部屋の殺菌などに用いられる15Wの紫外線ランプである。PCBとして使用された5塩化物中心のKaneclor 500を含むエタノール溶液を石英ガラスのセルに置いて紫外線ランプの脇に置き、紫外線照射を行った。照射したPCBをガスクロマトグラフで分析してみると、照射時間が長くなるに従ってピークの山が左に移動し、塩素置換数が減少していることが分かった(図1 A, B)。また、紫外線を照射し続けてもこれ以上反応は進行しなかった。次に塩素置換数の減少したPCBを、我々が土壤中より単離したPCB分解菌 *Comamonas testosteroni* TK102株で分解した結果、増殖基質として添加したピフェニルのピークが保持時間15分のところに認められるが、PCBのピークは全てなくなったことが認められた(図1 C)。

#### 4. スケールアップ化

基礎試験でPCB分解に成功したのを受け

て、実用化に向けてスケールアップを検討した。まず全容量が10lならびに90lの培養装置を用いて試験管レベルと同様、紫外線照射による脱塩素後のPCBの微生物分解を行った。培養装置を用いた場合、分解速度は試験管実験より向上し、通気攪拌による微生物増殖の効率化がPCB分解に大きく影響することが明らかになった。実際の処理システムでは微生物分解の方法に一工夫加え、性質の異なる2種類の分解菌を使い分ける2段階処理を用いて、約8日で初期濃度100mg/lのPCBを排出基準である3 mg/l付近にまで分解し、十分実用化に耐える結果を得た。ここで用いたPCB分解菌は、1000mg/l以上の高濃度PCB中でも増殖分解する *Comamonas testosteroni* TK102株と、25mg/l以下の低濃度でのみ増殖分解する *Rhodococcus opacus* TSP203株である。1段階で使用した *Comamonas testosteroni* TK102株は4塩化物のPCBまで分解するが、2段階で使用した *Rhodococcus opacus* TSP203株は6塩化物の一部まで分解する能力を持っている。これら2種類のPCB分解菌を用いて、1段階で

は4塩化物までのPCBを速やかに分解させ、2段では残留する比較的塩素数の多いPCBを分解させた。

以上の結果を踏まえて、大型の紫外線照射装置と1,000lの培養が可能な大型培養槽を備えたパイロットプラントを設置し、実証試験を遂行した。プラントの基本概念と写真を図2に示す。この際、排水量を少なくすることを目的として1段目の処理液のリサイクルを行った。具体的には、1段目の処理液の一部を連続遠心分離機に送り、上澄を2段処理に送り、沈殿物は細胞破碎後に1段の栄養として回収する方式を考案した。このシステムは1段で使用しているPCB分解菌 *Comamonas testosteroni* TK102株が栄養培地中でもPCB分解酵素遺伝子群を発現し、PCBを分解する性質を利用したものである。培養液をリサイクルすることで、1段目の菌濃度を飛躍的に上げることができ、PCBの分解も速やかであ

るという結果が得られた。また、2段目の処理液を分析した結果、ダイオキシンやコプラナPCBといった有害物質は検出されず、変異原性試験であるエイムテストの結果も陰性であり、環境に悪影響の無いシステムであることを確認した。

## 5. PCB処理のトータルシステム

PCB処理はオイルのみならず容器、汚染した土壌、ヘドロなど様々なものの処理をトータルで考えなくてはならない(図3)。汚染容器は溶媒で洗浄し、溶媒は本方法で無害化することができる。除染後の容器は部材として再利用可能である。また、汚染土壌の処理を目指して、現在PCB分解遺伝子を組み入れた植物の研究や、植物とその植物の根の周辺に特有に生息する根圏微生物を用いた無害化研究に着手している。また、PCB汚染したヘド

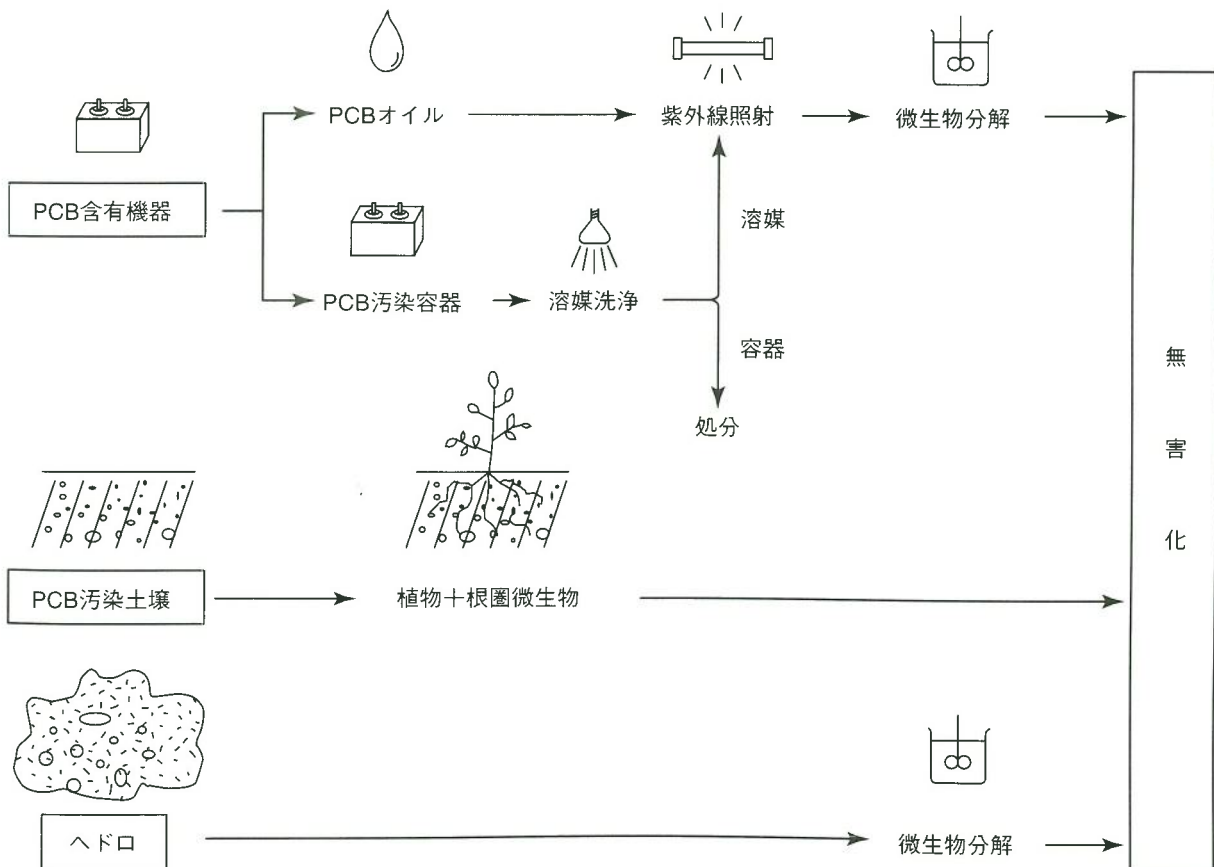


図3 PCB処理のトータルフロー

口は各地で検出されており、それらの処理も今後問題になると思われる。化学的に脱塩素したり超臨界水で酸化分解するなどの方法では、ヘドロ中の様々な成分の妨害が多く生物を用いた方法が有効であると考え、現在基礎試験を実施中である。PCB分解菌をヘドロに添加して培養を続けるといういたって単純な方法だが、現在用いているPCB分解微生物 *Comamonas testosteroni* TK102株は栄養培地中でもPCB分解酵素遺伝子群を構成的に発現しているため、有機成分が豊富なヘドロ中でもPCB分解ができるものと期待している。また、塩素数が3以下のPCBで1 mg/lなどの低濃度で汚染された水の処理は、紫外線処理することなく微生物のみで分解可能であることも実験の結果確認されており、微生物を用いれば土壌、水などの環境中のPCB処理は可能であると考えている。

ここで述べた紫外線照射と微生物分解とを組合せたPCB処理法は、25年以上続いている基礎研究から得られた成果を環境汚染の防止や浄化という社会のニーズを結びつけた成果であり、もっとも実用化に近い微生物処理法であるのみならず他の環境汚染物質に対しても応用可能な新技術であると考えている。

## 文 献

- 1) D. S. Duvall and W. A. Rubey, *EPA report*, EPA/600/2-77/228, December (1977)
- 2) 平岡正勝, 日本化学会誌, 5, 559-573 (1991)
- 3) K. Furukawa et al., *J. Agric. Food. Chem.*, 23, 594-595 (1975)
- 4) A. Gilman et al., *Organohalogen Compounds*, 26, 471-474 (1995)
- 5) L. O. Ruzo et al., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 8, 217-218 (1972)
- 6) M. Shimura et al., *J. Ferment. Bioeng.*, 81, 573-576 (1996)

## 国内情報

## 発光遺伝子を用いた植物病原細菌の生態学的研究

農林水産省 農業環境技術研究所

畔上 耕児

イネもみ枯細菌病菌に発光遺伝子を組み込んで、それが安定に維持され発現する組換え菌を得て、その挙動を明らかにした。組換え菌は薬と枯死組織で急激な増殖をすること、薬では1cfuという少量の菌でも感染が成立し3日後にはもみに褐変病徴が現れること、薬での増殖の後に穎で増殖・定着すること、イネ株元から上位への移動はイネの伸長に伴う感染部位の持ち上がりとも毛管現象によることなどが分かった。

## 1. はじめに

今日、先進国の農業は多くの資材を投入することによって成り立っているが、それが環境問題、農業生産基盤劣化あるいは生態系攪乱などの問題を起こす一因になっている。将来にわたってこのような生産方法を取り続けることはできない。持続的農業、環境保全型農業の実現に向けての努力は、我々の世代に課せられた責任である。過度に農業に頼った作物病害防除法も、見直していかなければならない。

環境に調和した病害防除法を確立するためには、病原菌側からは生理・生態あるいは発病機構の解明等が、作物側からは耐病性品種の作出、感染防御機構の解明等が必要である。また、それらを取りまいて発病を助長している環境を変える点から、栽培方法の改善や耕種的防除法の導入が必要である。あるいは、拮抗微生物を探索して生物的防除法を確立する必要がある。ここでは、発光遺伝子を用いた病原細菌の生態学的研究について、イネもみ枯細菌病菌を例に取り上げて紹介する。

2. イネもみ枯細菌病菌の生態の不  
明点

*Burkholderia glumae* は、関東以西の暖地では立毛中のイネに「もみ枯細菌病」を起  
AZEGAMI Koji

す重要病原細菌である。また、箱育苗にビニールハウス等による保温を必要とする地方では、「苗腐敗症」を起こすので、その対策なしに苗の安定的生産は図れない。

これまでの研究の結果、本菌は穎の柔組織細胞間隙や玄米表面に潜伏して種子伝染すること、育苗期間中に急激に増殖すること、田植え後は急激に減少するがイネ株元に潜伏し、穂孕み期頃以降になると上位葉鞘からも検出されるようになること、出穂期頃の高湿多湿、降雨は発病を助長すること、が分かっていた。しかし、本菌は苗ともみ以外には明瞭な病斑を形成しないことが多いため、どのようにして株元から上に移動するのか、なぜ穂孕み期頃になって容易に検出されるようになるのか、どこで増殖を開始するのか、については不明であった。

3. なぜ細菌の生態学的研究に発光  
遺伝子なのか？

病原細菌の挙動・生態は顕微鏡で明らかにされるもの、あるいは寒天平板培地上にコロニーを作らせて追跡すべきもの、というのが一般的な根強い考え方である。そこで、なぜ細菌の生態学的研究に発光遺伝子を用いるのかについて述べたい。

細菌は似たような形をしていることが多いので、顕微鏡では目的の細菌とそれ以外の細菌を、通常は区別することができない。また何よりも、顕微鏡や培地では目的の細菌がい

表1 細菌検出法としての発光遺伝子利用法とPCR法の違い

	発光遺伝子利用法	PCR法
大きな試料からの検出	○	×
増殖条件の検討	○	×
継時的観察	○ <sup>1)</sup>	×
定量	△または×	×または△
野外試験	×	○
野外試料からの検出	×	○
検出対象	生菌	特定DNA断片

1) 発光は細菌の増殖時に限られるので、長期間にわたって存否・存在場所を確認するためには、発光観察前に試料に増殖好適条件を与えることが必要になる場合もある。長期間にわたる試験では、あるいは蛍光物質生産遺伝子が用いられるようになるかもしれない。

2) 組換え菌を用いる実験なので、現時点では閉鎖系で行えない。

るかいないかについては、試料の1 mm 四方程度の大きさ毎にしか調査できない。このことが、細菌の挙動を追跡する際の最大の障害であったといっても過言ではない。

細菌が目に見える問題を起こしているときの検出は容易であるが、減少してどこかに潜ってしまったときの検出は困難を極める。その困難さは、浜の真砂ほどのいわゆる「雑菌」に取り囲まれている1細胞の病原細菌を検出することに喩えられるかもしれない。あるいは、当たるまで宝くじを買い続ける努力をすることに喩えられるかもしれない。

この困難さゆえに、細菌の生態については分かっていない部分が大きかった。その結果、不意の細菌の増殖と病気の突発を許してしまうということがずっと繰り返されてきた。

発光遺伝子と近年普及してきた2次元ルミノメータを用いるならば、このような細菌の挙動を追跡する上での大きな障害を解決しうる。これらによって、40cm 四方程度の大きな試料の中にある細菌でも、発光していれば丁度闇夜で光っている蛍を見つけるように検出できる。また、経時的追跡も可能である。

なお、高感度検出法としてPCR法もあるが、それとの違いは表1のようにまとめられるであろう。発光遺伝子利用による検出法は、細菌の未知の挙動を解明するのに向いている。

#### 4. 発光遺伝子、形質転換、発光の観察

本実験<sup>1,3)</sup>には、既に構築されていたプラスミドベクター pUCD620<sup>4)</sup>を用いた。これは海洋性細菌 *Vibrio fischeri* 由来の発光遺伝子(実際には5つの遺伝子)を持ち、生物発光のための基質と酵素の遺伝子を含んでいる。なお、生物発光は生体が発する極微弱光とは異なるもので、それよりも強いので容易に区別できる。

筆者は、この発光遺伝子をもみ枯細菌病菌の染色体に組み込んで、それが安定に維持され発現する組換え菌を得た。なお、筆者らはこの外にイネ苗立枯細菌病菌、イネ内穎褐変病菌、イネ白葉枯病菌、ナス科作物青枯病菌、タマネギ腐敗病菌等の細菌で、発光遺伝子を組み込んだ組換え菌を得ているが、形質転換の頻度、遺伝子の発現程度、安定性は種によって異なっていた。

発光は、通常のフォトンカウンターあるいは2次元ルミノメータ(浜松ホトニクス ARGUS-50, -20)を用いて調査した。後者は、暗箱内に置いた面的広がりを持った試料から発する光子(フォトン)を捉えて2次元的に積算して得られた画像と、その試料に蛍程度の弱い光を照射して得られた通常の画像をコンピュータによって重ね合わせて、発光部位を特定する機械である。

#### 5. 組換え菌の生理、挙動

もみ枯細菌病菌の組換え菌の発光は、対数増殖期なかばから定常期初めにかけて強く、それ以降は急減した(図1)。従って、組換え菌を植物に接種した場合の発光部位は、細菌が増殖している所を示しているが、暗い部分は細菌の不在を示しているわけではない。組換え菌の発光最適温度は20~23°C付近であった。また発光観察から、もみ枯細菌病菌は従来利用しないとされてきた糖・有機酸の中にも利用するものがあることが分かった。

組換え菌をイネに接種して高湿条件下でイ



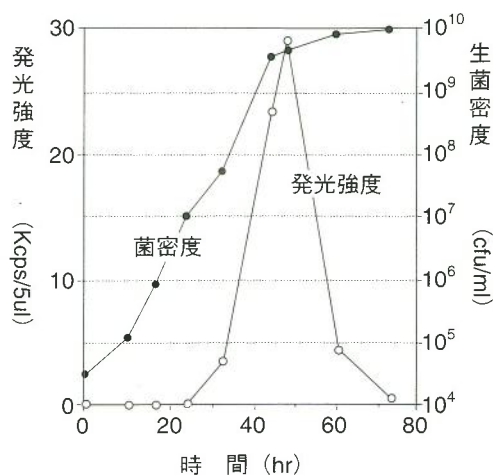


図1 発光遺伝子入りもみ枯細菌病菌の増殖と発光強度との関係

ンキュベートして、2次元ルミノメータで観察した結果、組換え菌は特に葯と枯死部分で急激な増殖をすること、緑色健全組織では増殖しにくいことが分かった。従来、高濃度菌液を噴霧接種した場合、2日後にもみに褐変病徴が現れるといわれてきたが、葯では1 cfu (Colony Forming Unit)という少量の細菌でも感染が成立し、菌数が急増して3日後にもみに褐変病徴が現れることが分かった。組換え菌は葯で増殖したのち、穎に移って増殖し定着した。組み換え菌は開花前の穎内にも入った。

組換え菌のイネの株元から上位への移動は、イネの伸長に伴う感染部位の持ち上がりと毛管現象によることが分かった。また、ダニが組換え菌を伝搬している例が観察された。

組換え菌は、イネ以外の植物の葯あるいは枯死した植物組織でも増殖した。シャーレ内実験であるが、乾燥しない状況に保たれた枯

死植物体上では、発光が接種後150日間観察された。

従来、もみ枯細菌病菌がなぜ穂孕み期頃になってまた容易に検出されるようになるのか、なぜ出穂期頃の高湿多湿、降雨が発病を助長するのか言及されていなかったが、組換え菌が葯に容易に感染し増殖したことで、これらに対する説明が可能であると考えられる。

## 6. おわりに

組換え菌を用いる実験は、現時点では閉鎖系で行うしかないので、例えば病原菌の風雨による飛散、伝搬についての検討は行えない。また、人体に悪影響を及ぼす細菌についてもこの方法の採用は難しい。細菌の生態の解明には、発光遺伝子利用法だけでなくPCR法やその他の方法を併用していく必要がある。

このような制約はあるものの、不明な部分が大きかった細菌の挙動・生態について、発光遺伝子と2次元ルミノメータが解明、証明できる点は多いと考える。生態解明によって、環境調和型病害防除法あるいは抵抗性品種育成のための基礎的知見が得られると考える。

## 文献

- 1) Azegami, K. (1996) *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 62: 161-166.
- 2) 畔上耕児 (1996) 日植病報62: 306, 640-641 (講要).
- 3) 畔上耕児 (1997) 日植病報 63: 254 (講要).
- 4) Shaw, J. J. et al. (1988) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1: 39-45.

## 国内情報

## 転写因子によるリグニン生合成の抑制

日本製紙・中央研究所  
河岡 明義・海老沼 宏安

パルプ化しやすい樹木の育種に活用するために、リグニン生合成の制御に関与する転写因子 Ntlim1 遺伝子をタバコから単離した。Ntlim1 タンパクは Pal-box と呼ばれる DNA 配列に特異的に結合し、転写活性化能を有していた。この遺伝子の発現をアンチセンス法で抑制した結果、リグニン生合成経路遺伝子群の働きを抑えることに成功し、リグニン含量を 30% 弱低減できることを見出した。

## 1. 高等植物のリグニン生合成経路

今後世界的に紙・パルプ用の木材資源が逼迫する中で、わが国の製紙会社が安定して木材資源を確保するには、海外における計画的な植林事業が欠かせなくなる。このため、パルプ化しやすく、しかも植林地で成長の早い樹木の開発は、重要な研究課題となっている。紙・パルプの原料となる樹木は、おもにセルロース約 50%、リグニン 20~30% で構成され、紙はこのうちリグニンを除去して作られる。したがってパルプ化しやすい樹木は、セルロースが多くリグニンが少ないものが望まれ、1990 年ころから世界的に遺伝子操作を用いた研究が行われてきた。高等植物において、リグニンはセルロースに次ぐ細胞壁構成成分である。細胞壁におけるリグニンの働きは、微細繊維を互いに接着する働きをしており、物理的、化学的な強度を高めている。

リグニン生合成経路は、アミノ酸の一種フェニルアラニンから複雑な経路によってモノリグノールが生成する。モノリグノールはペルオキシダーゼまたはカタラーゼによって脱水素重合し、リグニンが合成される。1990 年ころからリグニン生合成経路の構造遺伝子の働きを抑制し、低リグニン植物の作成が試みられてきた。この経路の構造遺伝子は様々な植物から単離され、モデル植物のタバコを

用いた実験では、リグニン量を 50% 以上減少させたものには、奇形を伴う形態変化や生育阻害も報告されている (1)。

今回、この生合成経路に関与する転写因子による制御を試みた。これまでに、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL)、シナメート CoA リガーゼ (4 CL)、シナミルアルコールデヒドロゲナーゼ (CAD) とペルオキシダーゼ (POD) の 5' 上流非翻訳領域の遺伝子発現に関わる A,C に富む 12mer の共通配列が報告されている (図 1)。この共通配列は Pal-box と呼ばれ、木部での遺伝子発現などに関与するシスエレメントとして報告され、リグニン生合成経路遺伝子群の発現に関して重要な配列と考えられている (2)。

インゲン Pal-2	-135	CTCCACCAACCCCGTTC
バセリ Pal-1	-193	CTCCAACAAACCCCGTTC
アラビドプシス Pal-1	-135	TCTCAACAACCTCTCTCT
バセリ 4CL-1/-2	-63	CTTTACCAACCCCCATC
ユーカリ CAD	-598	ATCCAACAAATAACACA
セイヨウワサビ prxC2	-107	CACCACTTGAGTACAAA
コンセンサス		CCAACAAACCC C T C T

図 1 Pal-box の保存性. Pal: フェニルアラニンアンモニアリアーゼ; 4 CL: 4-ヒドロキシクマル酸 CoA リガーゼ; CAD: シナミルアルコールデヒドロゲナーゼ; prx: ペルオキシダーゼ

## 2. Pal-box に特異的に結合するタンパクをコードする遺伝子のスクリーニング

DNAとタンパクの結合を利用したサウスウエスタン法により、このPal-boxに特異的に結合するタンパクをコードする遺伝子のスクリーニングを試みた。タバコの茎からcDNA発現ライブラリーを作製し、Pal-box配列を3回繰り返し戻した二本鎖オリゴヌクレオチドをプローブとして、スクリーニングを行った。その結果、 $1.0 \times 10^6$ 個のプラークから1つの陽性クローンが得られた。この陽性クローンを解析した結果、200アミノ酸残基から成るタンパク質をコードすると推定された。GenBankホモロジー検索から、このタンパクは、ヒマワリのSF3、チキンのCYSR、ラットのCRP2、ヒト、マウスのRHMなどのLIMドメインをもつタンパクと相同性が見られた。以後、このタンパク質をNtlim1 (*Nicotiana tabacum lim*) と表わすこととした。LIMドメインは、ホメオドメインをもつ3種類の転写因子、Lin-11, Isl-1, Mec-3のアミノ基末端部に共通に存在するシステイン残基に富むジンクフィンガーモチーフをもつ配列として見出され、これらの頭文字をとってLIMタンパクと名づけられた。LIMドメインの基本的な共通配列は(CX<sub>2</sub>CX<sub>16-23</sub>HX<sub>2</sub>C)X<sub>2</sub>(CX<sub>2</sub>CX<sub>16-21</sub>HX<sub>2</sub>C/H/D)で、2個のジンクフィンガーが2アミノ酸連結された配位をとる。これまでに、60種を超えるLIMタンパクが報告されている(3)。これらのなかには、転写因子、細胞骨格結合タンパク、プロテインキナーゼやGAP(GTPase活性化タンパク)ドメインをもつタンパク、または分子の大部分をLIMドメインだけが占めているタンパクなど、構造的にも機能的にも、さらに細胞局在性においても多様なタンパクが含まれている。Ntlim1は図2に示すように、2つのLIMドメインとC末側の酸性アミノ酸に富むドメイン(酸性ドメイン)の3つが見られた。サザン分析から、Ntlim1遺伝子はタバコゲノム中に、数コピー存在すると考えられた。また、このNtlim1遺伝

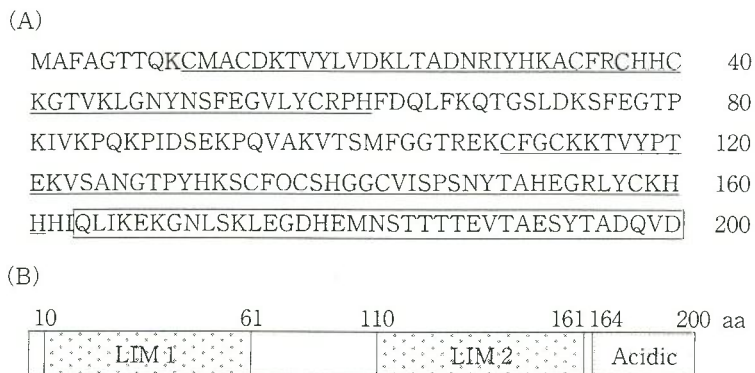


図2 Ntlim1のアミノ酸配列(A)、下線部分はLIMドメイン、囲み部分は酸性ドメインを表わしている。推定されるNtlim1タンパクの構造(B)

子は、タバコでは茎で多く発現し、葉での傷害による発現誘導は見られなかった。

## 3. Ntlim1 タンパクの機能

Ntlim1タンパクは、構造的にはDNA結合能が認められているジンクフィンガーモチーフをもつにもかかわらず、タンパク相互間の作用を担うドメインとして機能し、DNAへの結合するドメインとしては十分な証拠が示されていない。グルタチオンSトランスフェラーゼ遺伝子と単離したNtlim1遺伝子との融合遺伝子を構築した。大腸菌でこのGST融合タンパクを発現させ、アフエニティカラムを用いて精製した。精製したNtlim1タンパクは、ゲル移動度シフト法により特異的にPal-boxに塩基配列に結合することが明らかとなった。さらに、タバコ培養細胞を用いた転写活性化の実験から、Ntlim1は転写活性化能が確認された。従って、Ntlim1タンパクは標的となる特定のヌクレオチド配列に結合して、転写活性化する転写因子として機能していると予想された。これは、LIMドメインが生体内、試験管内でDNAと結合するという初めての知見である。

## 4. Ntlim1 遺伝子のアンチセンス・センス導入タバコの解析

次に、Ntlim1遺伝子の機能を調べるために、センス、アンチセンス方向にNtlim1 cDNAをCaMV35プロモーターの制御下に置

いたバイナリーベクターを構築した。これら  
をアグロバクテリウム感染法で、タバコに形  
質転換した。このうち、アンチセンス4系統、  
センス5系統の形態を非形質転換体と比較し  
たが、特に形態異常や生育障害は認められな  
かった。

これらの形質転換タバコの中から、効果的  
に導入遺伝子が働いているアンチセンス、セ  
ンスそれぞれ2系統の茎から全RNAを抽出  
し、PAL, 4 CL, CADの発現レベルを調査し  
た。センス個体において導入したNtlim 1は  
強く発現していたが、PAL, 4 CLとCADの転  
写量は野生型とほぼ同レベルであった。アン  
チセンス個体ではNtlim 1遺伝子の発現は抑  
制され、それに伴いPAL, 4 CLとCADの  
mRNA量が減少していた。

さらに、形質転換タバコの木質部のクラソ  
ンリグニン量を測定した。センス個体では、リ  
グニン量が増加した個体は認められなかった  
が、センス抑制のためか10%低下していたも  
のも得られた。最も低下したアンチセンス個

体では、野生型タバコに対し30%近い低下が  
見られた。

### 5. おわりに

以上のように、モデル植物であるタバコか  
らリグニン生合成を制御する転写因子Ntlim  
1遺伝子を単離した。この遺伝子のコードす  
るタンパクは、リグニン生合成経路の遺伝子  
発現に関わっていると考えられた(図3)。こ  
の遺伝子は茎で多く発現していたため、茎で  
強く発現するプロモーターを用いれば、さら  
に効果的に遺伝子発現を抑制できる可能性が  
ある。さらに、パルプの原料として使いやす  
い樹木を育種するために、植林木であるユー  
カリに導入を進め、この遺伝子の効果を評価  
したいと考えている。リグニン生合成経路の  
遺伝子発現に関与する転写因子の働きを抑制  
することで、生合成経路を統括的に制御でき  
ると予測され、紙・パルプの原料となる樹木  
のリグニン量を低減することが可能となるで  
あろう。

本研究の遂行に当たりは、日本製紙中央研  
究所の関係者のご協力いただいた。また、遺  
伝子解析については、奈良先端科学技術大学  
院大学の吉田和哉助教授から有益な助言をい  
ただいた。深く感謝申し上げます。

#### 参考文献

1. Campbell, M.M. and Sederoff, R.R., *Plant Physiol.*, vol.110, p.3-13, 1996.
2. Douglas, C.J., *Trend in Plant Sci.*, vol.1, p.171-178, 1996.
3. Taira, M. et al., *Trends in Genet.*, vol.11, p.431-432, 1995.

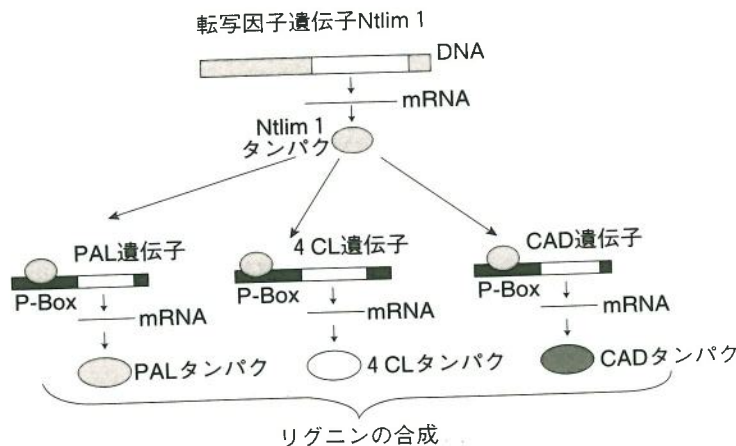


図3 転写因子Ntlim 1によるリグニン生合成経路遺伝子PAL, 4 CL, CADの転写活性化モデル。アンチセンス法でNtlim 1の発現を抑制することにより、各遺伝子発現がダウンレギュレーションを受ける。

地域の先端研究

# 水生植物を利用した茶園排水の 浄化とリサイクル化

滋賀県茶業指導所

今村 嘉博\*・志和 将一

茶栽培では慣行的に多量施肥栽培が行われてきた。しかし、茶園における肥料成分利用率は低く、硝酸態窒素等が相当量溶脱するため下流水域への環境負荷が問題となってきた。本稿では、地形連鎖を利用した茶園排水浄化システムの確立をねらいとして、ヨシ・マコモ等の水生植物を植栽した浄化フィルター(バイオジオフィルター)モデルによる茶園排水の浄化を検討したところ、硝酸態窒素を効果的に浄化することができたので紹介する。

## 1. はじめに

緑茶は日本の食生活に深く根付いた飲料だが、嗜好品であるため他飲料や産地間の競争が激しく、多量施肥による品質向上が図られてきた。その結果、窒素施肥量が100kg/10aと他作物からすると途方もない施肥管理が一般化した。これは、茶に多量の窒素成分を供給するとアミノ酸含有量が増加し茶の旨味が増すためだが、反面、肥料成分利用率は低下し硝酸態窒素等の溶脱量が増加することになる。硝酸態窒素は、平成11年2月に中央環境審議会の第1次答申において、新たに水質汚濁に関する環境基準の対象項目としてあげられ、その基準数値は10ppm(硝酸態窒素および亜硝酸態窒素)と示されている。

さて、本県における集団茶園のほとんどは中山間の傾斜地に存在し、茶園排水は直下に存在する水田地帯を経由した後、最終的に琵琶湖・淀川水系に達しており、これら流域への環境負荷が問題になると考えられる<sup>1)</sup>。

一方、水質浄化については各地で様々な取り組みがなされ、その中でヨシ・マコモ等の水生植物を用いた水質浄化について一定の知見が得られてきた。<sup>2, 3, 4, 5)</sup>

そこで、茶園と水田の地形連鎖を利用した茶園排水浄化システムの確立をねらいとして、  
IMAMURA Yoshihiro, SHIWA Masakazu  
\*現・甲賀地域農業改良普及センター

ヨシ・マコモ等の水生植物が植栽されている水田を想定した浄化モデルを設け、硝酸態窒素の浄化能力を検討したので報告する。

## 2. 浄化モデルの概要

浄化モデルは、茶園排水の採取・送水部と浄化フィルター(バイオジオフィルター)から構成されている。

茶園排水の採取・送水部は、5.0aの所内茶園(赤黄色土壌 定植15~16年 年間窒素施肥量:76.6Kg/10a)から暗渠排水を採取し、2基のタンク(3000ℓ×2)に貯水した後、定量送液ポンプで送水できる構造となっている。バイオジオフィルターは、0.9×0.9×0.6<sup>3</sup>mの水槽を底面から40cmの位置で3槽連結したものであり、ヨシおよびマコモ用に2系列設置した。この水田を模した各水槽に赤黄色土壌を約20cm充填したのち水生植物を定植し、採取した茶園排水を掛け流すことにより定植2・3年目における浄化能力の検討を行った(図-1)。なお、浄化水槽への送水は、ヨシ及びマコモの生育期間である4~10月にかけて行い、約3ℓ/h・2.4m<sup>2</sup>の流量で24時間連続送水した。

## 3. 茶園暗渠排水の特性

本試験において1年間に茶園より溶脱した硝酸態窒素量は年間窒素施肥量の13~15%で

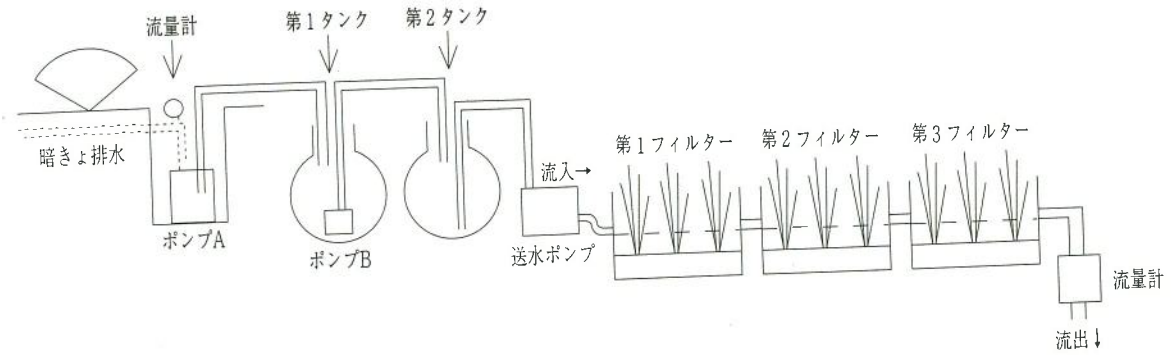


図1 浄化モデルの概略図

表1 暗渠排水による硝酸態窒素溶脱の推移

	H 8				H 9				
	期間 降水量 (mm)	期間 排水量 (L/5a)	NO <sub>3</sub> -N 排水濃度 (ppm)	NO <sub>3</sub> -N 溶脱量 (g/5a)	期間 降水量 (mm)	期間 排水量 (L/5a)	NO <sub>3</sub> -N 排水濃度 (ppm)	NO <sub>3</sub> -N 溶脱量 (g/5a)	
調査 期間中	4月	—	—	—	25.5	0	—	0.00	
	5月	71.0	4,200	36.15	149.5	7,900	26.37	208.31	
	6月	203.0	22,700	74.33	132.0	11,700	34.30	401.31	
	7月	76.5	10,200	74.54	760.27	408.0	58,700	49.42	2900.92
	8月	126.5	8,400	60.03	504.28	106.5	10,700	28.67	306.79
	9月	134.0	2,200	32.05	70.51	142.0	6,000	20.34	122.05
	10月	16.5	3,200	48.34	154.68	12.5	0	—	0.00
	合計・平均	627.5	50,900	65.40	3328.85	976.0	95,000	41.47	3939.38
年間	合計・平均	1188.0	88,800	55.20	4901.70	1663.5	172,000	33.29	5726.67

注1) 調査期間 H 8 : 5/6~10/12 H 9 : 4/17~10/18  
 注2) 年間窒素施肥量 76.6kg/10a

あった。そのうち4~10月の送水期間中に溶脱した硝酸態窒素量は年間溶脱量の約70%であり、濃度は20~75ppmの間で推移した(表-1)。

暗渠排水量・硝酸態窒素濃度には気象による年次的・季節的変動が見られる。年次的には、降水量が少ない年は暗渠排水量も少なく、硝酸態窒素濃度は高めで推移し、降水量の多い年は低く推移する。また、季節的には、梅雨時期である6~7月に排水量が多くなり、硝酸態窒素濃度もこの時期が最も高い。

#### 4. 水生植物の栽培管理

植物を利用した水質浄化においては、生育を終えた植物体を刈取りなどによって速やかに除去しなければならない。枯死した植物体

を放置しておくと新たな窒素負荷源にしなければならないからである。このため、10月になり生育を終えたヨシ及びマコモは刈取りを行い、各フィルターから持ち出した。また、平成8年度においては10月のみ刈取りを実施したが、7月以降各水槽の硝酸態窒素濃度が徐々に上昇する傾向が見られた。これは、ヨシ・マコモが同時期に栄養生長から生殖生長へ移行するため浄化能力が低下したためと思われる。平成9年度には10月期に加えて7~8月期にも刈取りを実施し、(年2回刈取り)ヨシ及びマコモの再生長による浄化能力の回復を図った。

#### 5. 浄化能力の評価

試験では浄化槽への流入量を固定したため、試験期間中に浄化処理できた水量は茶園暗渠

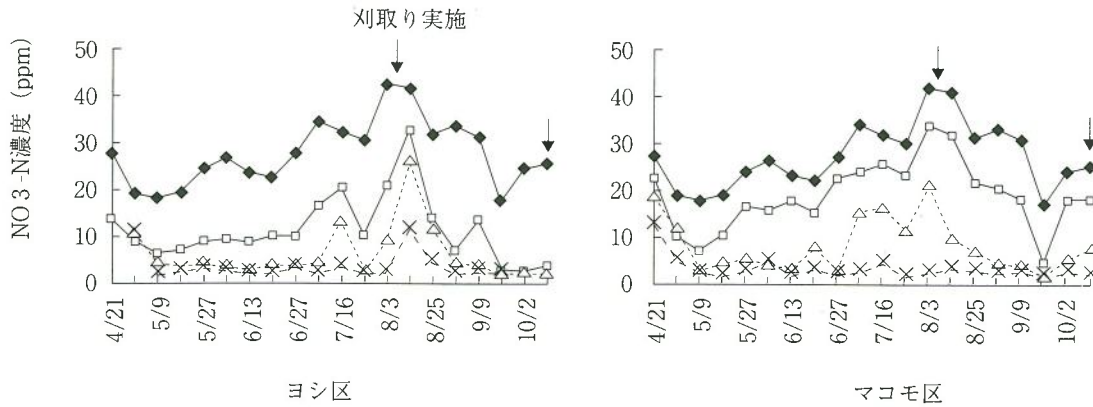


図2 H9（年2回刈取り）における各フィルター水槽のNO<sub>3</sub>-N濃度推移

◆ 供給水      □ 第1フィルター  
 △ 第2フィルター      × 第3フィルター

表2 調査期間のNO<sub>3</sub>-N収支、浄化率、浄化能、浄化植物N回収量

	NO <sub>3</sub> -N収支					浄化率 (%)	浄化能 (g/m <sup>2</sup> ・日)	浄化植物 N回収量 (g/m <sup>2</sup> )
	平均供給濃度 (ppm)	総負荷量 (g/m <sup>2</sup> )	平均ろ過後濃度 (ppm)	流出量 (g/m <sup>2</sup> )	総浄化量 (g/m <sup>2</sup> )			
H8ヨシ区 (年1回刈取り)	45.5	208.0	15.4	33.6	174.4	84	1.19	68.58
マコモ区 (年1回刈取り)	45.5	213.9	10.7	23.5	190.3	89	1.30	48.92
H9ヨシ区 (年2回刈取り)	28.7	161.9	4.4	16.0	145.9	90	0.8	78.38

注1) 調査期間 H8.5/6~10/12 H9.4/17~10/18  
 注2) 浄化率=総浄化量/総負荷量  
 注3) H9年のマコモ区は流量計故障のため欠測

排水量の28~43%であった。平成8年度は浄化水槽へ供給した茶園排水の硝酸態窒素濃度が45.5ppmと非常に高く、刈取りも10月期のみ実施したため、ヨシ・マコモとも第3フィルター通過後の平均ろ過後濃度を10ppm以下にすることはできなかった。しかし、バイオジョフィルターへ負荷した硝酸態窒素量の80%以上を浄化することができた。

これに対し、平成9年度においては、供給した茶園排水の硝酸態窒素濃度が28.7ppmであったことと、刈取りを2回実施したことにより浄化効果の向上が見られた。ヨシ・マコモともに第3フィルター経過後の平均ろ過後濃度は概ね5ppm以下であり、ほぼ全期間において水質基準である硝酸態窒素10ppm以下に抑えられた。また、ヨシにおける硝酸態窒素浄化率は90%と向上し、マコモにおいても同等の効果が得られたものと思われる。ただ

し、ヨシにおいて夏期刈取り直後に一時的な浄化能力の低下が見られたため、刈取り方法の改善が必要と考えられ現在検討中である(図-2, 表-2)。

## 6. 浄化窒素のリサイクル化

前述したとおり生育後の水生植物の植物体内には吸収された成分が蓄えられている。これまでの水生植物を用いた水質浄化の取り組みにおいては、浄化後の植物体の処理方法について問題が残されている事例が多い。このため、本試験では刈取り後のヨシ・マコモを再度茶園に投入することにより浄化成分のリサイクル化を図った。

刈取った植物体を分析したところ、浄化できた硝酸態窒素量のうち、ヨシでは40~50%マコモでは25%程度が植物体として回収でき

ることが認められたが、窒素含有量は1～2%と低く窒素源としての再利用には適さなかった。そこで、茶栽培において稲ワラ等により慣行的に行われているマルチ資材としての利用を検討したところ、ヨシについては稲ワラと同等で利用可能と評価された。マコモについても土壌改良資材として還元が可能である。

## 7. おわりに

以上のように、水生植物(ヨシ・マコモ)が植えられた浄化フィルターは高い浄化能力を維持することが認められ、また、硝酸態窒素濃度が30ppm以下の場合、本試験の条件下ではほぼ全期間環境基準以下まで濃度低下できることが確認できた。本成果は、今後集団茶園の集水域を考慮した浄化システムを確立するにあたって、規模判定基準の基礎資料になりうると考えられる。

問題点としては、①暗きょ排水量は季節的変動が大きく、安定した浄化能力を得るためには流量調節が必要。②浄化植物は必ず刈取る必要があり、刈取り作業の効率化が必要。③

効果の得られる期間が水生植物の生育期間に限られる。冬期の浄化対策が必要。④赤黄色土壌以外の茶園では暗渠排水の流出実態が異なる。などが残されており、実用化には更なる検討が必要である。

環境に対する問題意識は今後も高まると思われ、茶栽培においても環境負荷軽減は今日的な重要課題である。本技術は硝酸態窒素による環境負荷を軽減する有効的な手段になりうると考えられる。

## 文 献

- 1) 長谷川清善・奥村茂夫・小林正幸・中村稔(1985) 茶園・水田連鎖地形における富栄養化成分の行動, 滋賀農試研究報告, 第26号
- 2) 尾崎保夫(1993) 農耕地における肥料成分の動態と制御(1), 農業および園芸, 第68巻 第5号
- 3) 尾崎保夫(1993) 農耕地における肥料成分の動態と制御(2), 農業および園芸, 第68巻 第6号
- 4) 尾崎保夫(1993) 植物を利用した資源循環型水質浄化技術の課題と展望, 用水と廃水, Vol. 35 No.9
- 5) 中川元男・杉本博之・寺井和弘(1995) 水生植物による琵琶湖流入河川の浄化実験, 環境システム研究, Vol.23



## 文献情報

マウス精子における  
fertilin  $\beta$  の役割

fertilinは、哺乳動物精子の細胞膜に存在し、 $\alpha$ と $\beta$ からなるヘテロダイマーであり、精子と卵子の結合、融合、そして卵子の活性化を促進させる。Choらは、fertilin  $\beta$ のノックアウトマウスを作出し、fertilin  $\beta$ 欠損マウスは不妊であること、またそれは精子に起因することを報告している。

ノックアウトマウスは、精巣で特異的に発現しているfertilin  $\beta$ のexon 14を欠損させ、作出した。fertilin  $\beta$ 欠損マウスは、雄も雌も正常に発育、成長した。雄では、精子および精子形成過程の細胞で、fertilin  $\beta$ タンパクとその前駆体が存在していなかった。このマウスでは、fertilin  $\alpha$ の前駆体が減少していた。fertilin  $\beta$ 欠損マウスの精子を顕微鏡観察したところ、形態的には正常であった。精巣上体中および射出精液中の精子数や運動性は、正常個体のそれと違いは認められなかった。また、ノックアウトマウスの精子の受精能獲得過程における先体反応も正常であった。

透明帯を除去した卵子と精子の相互関係について検討したところ、fertilin  $\beta$ 欠損精子は、正常精子と同等に卵子表面に接触するが、そのほとんどが卵子の膜に付着することができず、卵細胞膜への結合は正常精子の8分の1に減少していた。fertilin  $\beta$ 欠損精子の卵細胞膜との融合率は正常細胞の45-50%であった。精子と卵子の接着過程においてfertilin  $\beta$ と卵子のレセプターの相互作用と卵子の活性化を検討したところ、fertilin  $\beta$ 欠損精子が侵入した卵では、活性化の初期におきるカルシウムオシレーションのパターンと頻度、さらに第2極体の放出率は正常精子のそれと差はなかった。この結果から、fertilin  $\beta$ は卵子の活性化には関与していない事が分かった。fertilin  $\beta$ 欠損精子は透明帯を除去しない卵子に対しては、透明帯と結合することができなかった。fertilin  $\beta$ 欠損雄と正常雌を交配させ

ると、正常な運動性をもつ正常数の精子が子宮内に存在していたが、卵管内にはわずしか見られなかった。このことから、fertilin  $\beta$ 欠損精子は、卵管への移動に欠陥があった。精子形成過程でfertilinを欠損させた結果、fertilinは精子と卵子の膜の相互関係に直接的な役割を果たしている事が明らかになった。また、fertilinは精子と透明帯の結合や卵管への移動にも直接的に働いていた。正常な運動性の精子が受精の場である卵管まで到達できないことから、子宮上皮と結合している可能性も考えられる。

(抄訳 松本浩道—東北大農)

(MATSUMOTO Hiromichi)

Fertilization defects in sperm from mice lacking  
fertilin  $\beta$ 

Chunghhee Cho, Donna O'Dell Bunch, Jean-Emmanuel Faure, Eugenia H. Goulding, Edward M. Eddy, Paul Primakoff, Diana G. Myles  
Science, 281: 1857-1859, 18 September, 1998

## 文献情報

*Lactobacillus acidophilus* の  
酸および胆汁酸耐性株の分離とその性質

乳酸菌には様々な生理機能があることが知られており、健康を補助する probiotic bacteriaとして利用されているが、この際に問題となるのは、乳酸菌が生きて腸内に届くかどうかということである。食品として摂取された乳酸菌は、まず口腔内の消化酵素にさらされ、次にpH1.5の胃内で消化酵素にさらされる。胃を通過するのに約90分かかるといわれており、さらに小腸では胆汁酸が分泌されている。これらの過酷な環境を生き残った乳酸菌だけがprobioticとして健康に寄与できるのであるが、多くの乳酸菌では酸耐性などに関する性質は調べられていない。そこで筆者らは、*Lactobacillus acidophilus*から酸および胆汁酸耐性株を分離し、その性質について調べた。

*L. acidophilus* 7株をpH3.5のMRS培地で37°C、90分間(胃内を想定した条件)培養し、

培養前後の生菌数を比較したところ、ほとんど差はなく、全ての株がpH3.5で90分間という条件には耐性を持っていることがわかった。そこで、それぞれの株について、培養後に生育してきた10コロニーずつをMRSプレート(pH3.5)で37℃, 24時間培養後、さらにMRS培地(pH3.5)で生育したものを酸耐性株とした。検討した7株のうちATCC43121, 33200, 4962株から酸耐性株4株を得た。

次に、得られた酸耐性株を、胆汁酸を0.3%添加したMRSプレート(pH4.0)で37℃, 24時間培養し、生育してきたコロニーのうち、さらに胆汁酸添加MRS培地で生育した18株を酸及び胆汁酸耐性株とした。凍結処理による影響を確認したところ、-70℃で2日間凍結すると、多くはpH3.5での生育能(酸耐性)を失っていた。筆者らは18株のうち、酸耐性を維持していた2株について詳細な解析を行った。

消化系をモデルにして、MRS培地(pH3.5)で90分間培養した後、0.2%胆汁酸を添加したMRS培地(pH6.8)での生育を経時的に比較した結果、親株(ATCC33200)は生育は早いものの6時間後に急激に菌数が減少したのに対し、酸耐性株は6時間後には定常期に入り菌数は安定していた。酸及び胆汁酸耐性株は生育は非常に遅いものの、8時間後まで減少することなく増加しつづけた。筆者らは、耐性株は細胞を守る何らかの機能性タンパク質を持っているのであろうと考察している。

酵素活性については、酸及び胆汁酸耐性株の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性やアミノペプチダーゼ活性は親株より低いものの、菌体外プロテアーゼ活性はやや高めで乳内増殖性が親株より高く、乳発酵に適していると考えられた。また、耐性株は親株がもっている2つのプラスミドを失っており、細胞壁の脂肪酸組成も全く異なるなど、親株とは異なる性質を示した。

以上の研究により、消化系をモデルとした条件で選抜することで、probioticとして用いるために重要な酸及び胆汁酸耐性を持つ株を得られることが示された。乳酸菌の酸耐性や

胆汁酸耐性のメカニズムを解明するためにも、耐性株のさらなる詳細な解析が期待される。

(抄訳 石田 優 カルピス(株))

(ISHIDA Yu)

Isolation and Characterization of Acid- and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*

LAN-SZU CHOU and BART WEIMER *J. Dairy Sci.* 82: 23-31 (1999)

#### 文献情報

### コムギ実生を急速に冷却することによる生長速度と茎のサイトカイニン含量の急激な変動

動物のように神経系が発達していない植物におけるシグナル伝達については未だ不明瞭な点が多い。しかしながら、植物においてもシグナル伝達が速やかに行われることはよく知られており、その機構の解明に興味を持たれている。本文献において著者らは、根に受けた刺激が速やかに地上部へと伝えられる機構を細胞分裂や肥大に関与し、主に根で生産される植物ホルモンであるサイトカイニンとの関係から解明しようとした。

24℃で1週間生育させたコムギ実生の根を4℃で冷却したところ、第2葉の生長速度が冷却後15分で急速に低下し、約30分後にはほとんど生長は停止した。茎のサイトカイニン含量も根の冷却によって第2葉の生長速度と同じようなパターンで急速に減少したが、その含量の減少は第2葉の生長速度の減少よりも速やかであった。一方、根のサイトカイニン含量は第2葉の生長速度および茎のサイトカイニン含量とは異なった変化をした。すなわち、根のサイトカイニン含量は冷却後10分で冷却前の約1.5倍に上昇した後、減少した。また、植物体全体のサイトカイニン含量は冷却により常に減少した。

これらの結果から著者らは根の冷却による生長速度の急激な低下とサイトカイニン含量の関係を以下のように推察した。サイトカイニンが葉の細胞分裂や肥大に関与しているこ

とは既に明らかにされているので、この研究における葉の生長速度の低下、停止はその直前に起こった茎のサイトカイニン含量の急激な減少によるものである。また、茎のサイトカイニン含量が根の冷却により減少し続けたのに対して、根のサイトカイニン含量が一度増加してから減少したことも説明可能である。まず、根の冷却によって根から茎へのサイトカイニンの移動量が減少する。このため、冷却10分後には行き場を失ったサイトカイニンが根に蓄積するため、その含量が一時的に増加する。但し、根の冷却はサイトカイニンの移動量だけでなく、根における生産量をも減少させるため、その後、根におけるサイトカイニン含量は減少を続ける。

本研究では高感度センサーを用いることにより、正確な植物の生長速度を連続してモニターした。今後、この方法を利用することで植物における刺激と生長との関係や、その他シグナル伝達に関する研究が発展することが期待される。

(抄訳 山本雅史一鹿兒島大農)

(YAMAMOTO Masashi)

Fast changes in growth rate and cytokinin content of the shoot following rapid cooling of roots of wheat seedling.

Kudoyarova, G. R., R. G. Farhutdinov, A. N. Mitrichenko, I. R. Teplova, A. V. Dedov, S. U. Veselov and O. N. Kulaeva

*Plant Growth Regulation* 26, 105-108 (1998)

#### 文献情報

長いままでは毒、切り刻めば薬？  
—ヘパリンオリゴ糖がアルツハイマー病治療薬になる可能性がある—

アルツハイマー病 (AD) は進行性の脳の变性疾患であり、高度の痴呆をきたして人格が崩壊し、やがて死に至る病である。

現在販売されているAD治療薬は、エーザイが開発したドネベジル (商品名: アリセプト) に代表されるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害剤のみである (日本未発売)。

AChE 阻害剤は、軽症から中等症の患者で効果が認められるが、神経変性を止める効果はなく、投与を中止すると知的機能は未投与群と同等になってしまう。つまり、「対症療法薬」なのである。

AD患者の脳には、アミロイド斑 (老人斑) と呼ばれる「脳のシミ」がきわめて多く観察され、アミロイド斑の数や分布の差が病理診断の基準とされている。アミロイド斑の主成分は $\beta$ -アミロイド ( $\beta$ A) と呼ばれるたん白質であり、その多量体に神経毒性があることがわかってから、「ADの原因物質ではないか」と注目されている。「 $\beta$ Aたん白質の神経毒性から神経細胞を守る薬」はADの「根本治療薬」となる可能性がある。

ヘパリン硫酸プロテオグリカン (HS) は、そのヘパリン硫酸 (HS) 部分で $\beta$ Aたん白質と結合し、多量体化を促進する。また、HSはたん白質分解酵素やマイクログリアのファゴサイトーシスから多量体を守る作用ももつ。HSは、アミロイド斑の形成と維持に関係している。HSはADに関しては一種の「毒」だと考えられる。HSは、 $\beta$ Aたん白質および/また $\beta$ A前駆たん白質 (APP) と結合することで作用を発現すると考えられている。したがって、血液-脳関門 (BBB) を通過し、 $\beta$ Aたん白質あるいはAPPとHSの結合を阻害する物質はADの「根本治療薬」となる可能性がある。ヘパリンは、HSと類似の構造をもつグリコサミノグリカン (GAG) である。2つのGAGは構造が似ているだけでなく、「抗凝血活性をもつ」、「塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) の活性を調節する」など、機能的にも類似性が高い。ヘパリンはHSと同様に、 $\beta$ Aたん白質と結合して多量体化を促進する作用をもつことも報告されている。さらに、神経芽腫細胞においてAPPの合成と分泌を促進することも報告されている。ヘパリンもADに関しては一種の「毒」だと考えられる。

ここでは、「BBBを通過するヘパリンオリゴ糖がAPP分泌とヘパリンの $\beta$ Aたん白質への結合を阻害する」という表題のLeveugleらの文献を紹介する。彼らは、ヘパリンオリゴ

糖誘導体（ヘパリンを亜硝酸分解によって重合した後、ポロハイドレーションによって還元末端を還元した糖アルコール体）の作用を検討した。ヘパリンオリゴ糖誘導体は単独では神経芽腫細胞のAPP分泌に影響を与えずに、ヘパリンが誘導するAPP分泌促進作用を強く阻害した。検討した中では、2糖誘導体の作用が最も強かった（2糖、4糖、6糖以上の混合物の3つで試験を実施）。ヘパリンオリゴ糖誘導体は、ヘパリンと $\beta$ Aたん白質の結合も阻害した。さらに、in vitro試験でBBBを通過することも確認した（この試験で用いたin vitro BBB系は、in vivoでの通過性と良好な相関があることが知られている）。これらの結果から、筆者らはヘパリンオリゴ糖誘導体、特にヘパリン2糖誘導体、やその類縁体がアミロイド形成過程を阻害あるいは遅延させ得る可能性があり、ADの「根本治療薬」となる可能性がある」と結論付けている。

ヘパリンはAD患者の脳にとって「毒」だが、それを切り刻んで短くしたヘパリンオリゴ糖は「薬」になる可能性があるということか。蛇足になるが、抗凝血剤として投与されるヘパリンはBBBを通過できないので、ADに悪影響を与えないことを付記しておく。

ヘパリンオリゴ糖でなくてもよい。私がADにかかる前に根本治療薬が開発されることを切に望む。かからなければ、それに越したことはないが、その保証はないのである。

（抄訳 八塚信明—マルハ（株））

（YATSUKA, Nobuaki）

Heparin oligosaccharides that pass the blood-brain barrier inhibit  $\beta$ -amyloid precursor protein secretion and heparin binding to  $\beta$ -amyloid peptide

Leveugle, B., Ding, W., Laurence, F., Dehouck, M., P., Scanameo, A., Cecchelli, R., Fillit, H.

Journal of Neurochemistry, 70: 736-744 (1998)

海外便り

## 酵母細胞骨格制御機構に関する分子生物学的研究 — フランス細胞分子生物学研究所での1年間 —

農林水産省 農業生物資源研究所

北本 宏子

### はじめに

1998年は日本におけるフランス年、自由の女神像やピカソ美術館の絵画が日本にきた。また、1997年はフランスにおける日本年、百済観音や大相撲がパリに行った。絵画、料理、ファッションや映画など日本とフランスの文化交流の歴史は長い。一方では産業構造も移民の状況も研究のスタンスも日本とフランスでは大きく異なっている。人々が最も大切にするものも、おそらく。

筆者は、1997年5月から1年間、ストラスブール、ルイ・パスツール大学 (ULP) 構内にある細胞分子生物学研究所 (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, IBMC)、ロベール・マルタン教授のもとで在外研究する機会を得た。ルイ・パスツール大学はストラスブール大学の自然科学系学部・大学院の総称であり、学生・スタッフ22,000人を越える国内最大級の理科系大学である。名前の通り、パスツールはここで酒石酸の光学分割に関する研究を行っている。CNRSはフランスの科学系国立研究所の総称で、ほとんどが大学と併設されており、人材、設備の相互高度利用がなされ、大学院生はどちらの研究室で研究を行っても良く、どちらの教授も学位授与権を有している。ストラスブールは、ライン川に沿った主要都市の一つであり、地の理を生かした国際共同研究も活発である(パリよりもブリュッセル、デュッセルドルフ、ハイデルベルグ、ミュンヘン、チューリッヒ、ザルツブルグ、ミラノの方が距離的に近

KITAMOTO K. Hiroko

い)。筆者が所属した研究室も、出芽酵母ゲノム解析プロジェクトEUグループに参加し(1996年4月に真核生物としては初めて、出芽酵母全ゲノム(約12Mb)の塩基配列が公開された)、現在はポストゲノム研究として取り組まれているEUのEUROFANプロジェクト(出芽酵母ゲノムの体系的機能解析研究)に参加している。

### なぜ飼料の研究から酵母の基礎研究に展開したか

筆者が入省後主として取り組んだのは、反芻家畜の発酵保存飼料(サイレージ)の発酵制御であった。制御には、酵母の生育を選択的に抑制する蛋白質を生産する「キラー酵母」を利用した。キラー酵母は自然界に多く見いだされているが、実はキラー現象のメカニズムはほとんどわかっていない。また、栄養条件など外界の状況が変化すると、細胞は分裂や形態を変えるが、この刺激と応答のメカニズムも未知である。筆者の研究の興味は、「外界の刺激を利用して細胞の形態や増殖と分化を制御する」方向に推移していった。しかし、同じ酵母の研究でも、バイオテクノロジーの分野と細胞形態形成などの基礎研究では、用いる技術と研究アプローチ手法が異なり、細胞生物学に長く取り組んでいる研究室でこれらを拾得するのが留学の主目的であった。

### 酵母のポストゲノム研究

人類は数千年前から酒を飲みパンを食べて、知らず知らず出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を利用してきた。200年ほど前か

ら、アルコール発酵のなぞを探るために出芽酵母の生化学・生理学が探求され、単細胞真核微生物で有性世代(n)と無性世代(2n)を生活史に持つことから、古典遺伝学の研究材料になった。また、ここ20年の間に出芽酵母の分子遺伝学手法は飛躍的に進み、細胞周期に関係する遺伝子の解析をしてみると、カエルの発生の研究過程で見いだされた遺伝子と同じものが多数見つかり、真核生物のモデルとしての有用性が認識された。このように出芽酵母は生活史が短く、遺伝解析が容易で、ゲノムサイズが小さいが、真核生物が持つ基本的な遺伝子は備えているという背景からゲノム解析が行われた。その結果、出芽酵母の約6000のORF(open reading frame)のうち約3/5の機能が未知であることがわかり、現在研究者らは遺伝子の機能解析に取り組んでいる。このなかで、転写制御、タンパク質の相互作用による生体内ネットワークの研究や、細胞形態形成などの新しい研究分野が開花してきた。

### 生物の形を決める細胞骨格

細胞が外的刺激に応答して形を変える時、細胞の中に非対称が生じ、細胞骨格と呼ばれる蛋白質の繊維の網目構造が変化している。酵母と動物細胞双方の研究から、外的刺激は受容体を介して細胞内のG蛋白質(G蛋白質は結合しているGDPをGTPに交換した後、GTPを分解して下流に信号を送る)の活性化を行い、活性化されたG蛋白質はミオシンの集合、アクチンの重合といった細胞骨格の掛け替えを引き起こすことがわかってきた。出芽酵母の細胞分裂は、母細胞から芽が出るようにして娘細胞が作られるが、極性の選択と分裂を順調に行うには、芽が形成される部位で複数のG蛋白質の局在に続くアクチン粒子の局在、およびアクチン繊維の形成が必要である。筆者が所属した研究室では出芽酵母のアクチン粒子の重合過程に関連する蛋白質のネットワーク機構について研究を行っていた。

### 酵母のアクチン制御

研究室ではじめに与えられたテーマは「アクチン関連遺伝子(アクチンと相同性が高い遺伝子)の変異株による、アクチン挙動の解析」であった。続いて「WASP関連蛋白質による、アクチンとアクチン関連蛋白質の制御」に研究をシフトさせた。研究の課題についてはグループ内で何度も綿密なディスカッションをして、最善と思われる方向に展開させることができたと思う。我々6人(うち学生2名)は、アクチンの制御に複数のアクチン関連遺伝子が不可欠で、その上流にWASP蛋白質と相同性が高い蛋白質が位置することを見だし(WASPは動物細胞のアクチン制御においてG蛋白質のすぐ下流にある)、これらの蛋白質のネットワークに関連する複数の蛋白質を拾い出した。この過程で、出芽酵母の遺伝学的手法、細胞生物学的手法、生化学的手法など、酵母の細胞を研究する上で必要な技術と研究アプローチ法が修得できた。

ヨーロッパの研究者のスタイルは、自分の研究する領域を限定し、周辺の研究を行う研究者と綿密なネットワークを組み、材料と情報の交換を積極的に行っている点が印象的であった。出芽酵母の細胞生物学は各国の研究者が競う分野である。我々の主要な成果のひとつも、アメリカのグループに先に発表されてしまった。これを聞いたあるスイス人の研究者がこのように言った「出芽酵母の研究者の人数から推定すると、あなたと同じ蛋白質を研究している者が5人いると思いなさい、研究の進展のために彼らを探して研究分担を話し合いなさい」彼らは常にscienceのために研究をしているというスタンスを崩さなかった。

### 雑感

留学中に最も印象深かったのはフランスの食の豊かさである。フランスは国民の地元定着率が高く、農業従事者は誇り高く、広大な国土に農地が広がる。フランスの食糧自給率



写真1 ストラスブールが属すアルザス地方の風景

は140%以上、日本は40%そこそこである。一方、フランスの第2次産業は国営企業が多く脆弱で、ストライキばかりするし、失業率も高い。第3次産業も同様で、サービスは悪く、お客様は神様ではない(レストランは別だが、サービスは高価であると双方とも合意している)。失業率の高さと移民の多さは常に問題となっているが、社会保障は手厚く、失業者も定年退職者も不安が少ない。ほとんどの国民は物質的に質素な生活をしているが、食べることの喜びを重視し、食品を選ぶ目はたいへん厳しい。「有機農産物」や「〇〇地域産」等の表示の基準は厳密で、例えば家畜の飼料のルーツに至るまでたどることができるそうだ。海から約千キロ離れたストラスブールのスーパーマーケットでも魚介類が何種類も美しく盛られている。筆者の息子は現地の保育所に通ったが「グルメ週間、いろいろな味を見分けましょう」という行事には驚いた。春から日長が長くなり、仕事の後隣家では家の修理



写真2 研究所の前で

や庭仕事、バーベキューをしている。教会の鐘の音やつぐみの歌声が聞こえ、ゆっくりと時間が過ぎてゆく。フランス人達はここに生活の質を見いだしている。「飢える」ことがない国の豊かさに感じられた。

## 特別情報

# バイオテクノロジー産業の創造に向けた 基本方針について

農林水産省農林水産技術会議事務局 先端産業技術研究課

小林 康弘

バイオテクノロジー研究の促進及びその成果を活用した産業化に向けて、科学技術庁、文部省、厚生省、農林水産省及び通商産業省が一丸となって取組を強化する必要があるとの認識に立ち、平成11年1月29日に、上記五省庁による関係閣僚申合せを行った。以下にその内容と農林水産省の主な取組を紹介する。

## はじめに

バイオテクノロジー分野では、今後、高品質・高収量の作物の開発や環境保全型農業の確立、機能的食品等農林水産業、食品産業をはじめとした幅広い産業分野において、質の高い雇用の場と新規ビジネスの機会をもたらすとともに循環型経済社会の実現に貢献することが強く期待されている。

一方、欧米各国政府は、バイオテクノロジーに関する研究開発やそれに関連する産業振興の取組を急速に強化している。このような中、生物遺伝資源の有限性と欧米における特許化に向けた重点的投資にかんがみると、これからの数年が将来の産業発展のため基盤整備を図る極めて重要な時期に当たると考えられる。

本基本方針は、バイオテクノロジーに関する研究の促進及びその成果を活用した産業化に向けて、科学技術庁、文部省、厚生省、農林水産省及び通商産業省が一丸となって、抜本的に取組を強化する必要があるとの認識に立って、申し合わせたものである。

## 1. 将来展望

平成22年(2010年)に、バイオテクノロジー関連市場の市場規模が25兆円程度、バイオテクノロジー関連の新規事業者の創業数が1,000社程度まで増大することを展望して環境

KOBAYASHI Yasuhiro

整備を目指す。

## 2. 産業化の加速的促進のための施策

### (1) ゲノム解析等の基礎的・基盤的研究の加速的推進

生物遺伝資源やDNA、たん白質等に関する情報は、今後のバイオテクノロジー産業の発展の基盤であり、特に公的部門におけるヒト、イネ、家畜、微生物等のゲノム構造解析及びたん白質の解析を通じた遺伝子機能の解明等を加速するとともに、こうした情報の産業界への提供を一層推進する。

#### [農林水産省の取組]

「ゲノム科学に関する研究開発についての長期的な考え方」(科学技術会議ライフサイエンス部会ゲノム科学委員会、1998年6月)に沿ってゲノムの研究は行われているが、イネ、家畜については農林水産省が中心となってゲノム構造の解析と遺伝子機能の解析に取り組んできており、11年度から、21世紀グリーンフロンティア研究において、最新の遺伝子解析手法を用いた遺伝子機能解明研究を行い、イネ・ゲノム有用遺伝子の特許化を加速するなど、今後も一層の強化を図ることとしている。また、ゲノム構造解析情報等はジーンバンク事業において提供されている。

### (2) 事業化支援の強化

遺伝子情報の特許化等に向けた研究開発は、バイオテクノロジー産業の成長の核であり、



研究開発活動に加え、これらの研究開発活動を行う新規事業者が要する多額の初期投資に対し公的支援を行うとともに、新規事業者の創業へのソフト面の支援を含むインキュベーション施設の整備等により、研究成果を事業化するベンチャー企業の集積形成を一層促進する。

[農林水産省の取組み]

11年度において、農林水産業・食品産業等先端産業技術開発事業、及び農林水産新産業技術開発事業を拡充するとともに、生物系特定産業技術研究推進機構融資事業に研究開発型企業特別融資制度を創設するなど、事業化支援施策の充実に努めている。

### (3) バイオテクノロジーの実用化に向けた技術開発の強化

ゲノム研究で得られた遺伝子を用いた有用動植物・微生物の開発やより効率的な遺伝子組換え関連技術、遺伝子組換え動物により有用物質生産を実現するための家畜クローン技術等ゲノム研究の成果の実用化に向けた技術開発を強化する。また、バイオテクノロジーと情報化技術を融合するバイオインフォマティクス技術、環境負荷の軽減や有用物質の効率的な生産に資する技術等について民間事業者の能力を活用する等事業化を念頭においた研究開発に対する支援を強化する。

[農林水産省の取組]

11年度から、21世紀グリーンフロンティア研究において、遺伝子組換え及びクローン技術による画期的な動植物の開発、植物・動物・昆虫を用いた有用物質生産系の確立を行うなど、実用化に向けた技術開発に積極的に取組むこととしている。また、研究プロジェクトに民間事業者が参画する等積極的に民間事業者の能力の活用を努めている。

### (4) 大学等におけるバイオテクノロジー研究の推進と利用の促進

バイオテクノロジー分野の最先端研究を行っている大学等の研究機関による研究の推進は、研究成果が事業に直結しやすい当該分

野においては不可欠であることから、競争的研究資金の拡充を進めることにより研究インセンティブを高めるとともに、基礎研究から産業応用までを一貫して推進するための拠点を整備する。さらに、これらの研究成果の事業化を促進するため、研究成果の特許化の支援及び成果利用の促進を一層推進する。また、技術移転機関（TLO）の整備・活用を図るとともに、国立大学教官等が民間企業の役員として積極的、主体的に関与することを認めることについての検討を行う。

[農林水産省の取組]

国の試験研究機関の研究成果の利用を促進し、民間において実用化が図られるよう、11年度から、国が保有している特許の応用可能性調査や国と民間をつなぐコーディネーターの設置等を行う研究成果移転促進事業を実施することとしている。

### (5) ネットワーク化の推進等産学官の連携の強化

生物遺伝資源やDNAデータ等の一層の利用を図るため、全国の知的基盤を提供する機関の充実及びネットワーク化を進めるとともに、大学、国立試験研究機関等の研究成果の事業化を促進するよう、研究成果に係る情報提供を充実する等産学官の連携強化を推進する。

### (6) 適正な安全確保と規制の適正化

バイオテクノロジーに関する安全性を確保し、当該技術の社会的普及を促す観点から、安全性関連のデータ及びこれらのデータに基づく客観的かつ科学的な安全性評価システムの一層の充実を図る。また、バイオテクノロジーの産業面への応用に関する制度については、国際的な動向に配慮しつつ、独創的な研究開発等を阻害することがないように、引き続き一層の改善を図る。

[農林水産省の取組]

農林水産省では、ガイドラインに基づき、農林水産技術会議の組換え体利用専門委員会において科学的見地から審査し、組換え農作物

等の環境に対する安全性の確認を行っているが、安全性評価システムの一層の充実を図るため、11年度から、今後新たに実用化が想定される組換え農作物等の安全性評価手法の開発、新たな分析技術を安全性評価に応用するための研究・開発等を行うこととしている。

(7) 知的財産の適切な保護

バイオテクノロジーにおける知的財産保護の重要性にかんがみ、特許制度及びその運用の国際的調和を一層推進する。

(8) 国民的理解の促進

遺伝子組換え技術の利用を始め、バイオテクノロジーが社会にもたらす成果について国民への科学的かつ客観的な情報提供の充実を図るとともに、ゲノム情報を始めとしたヒト

遺伝子情報やその元となる生体由来試料の取扱いについて生命の尊厳への配慮と個人情報の保護が適正になされるよう環境整備を進め、国民の理解を促進する。

[農林水産省の取組]

バイオテクノロジーの産業化のためには国民の理解を得ることが極めて重要であるとの認識から、各種広報活動を通じて国民への情報提供を行っている。

おわりに

基本方針に基づく施策を実施するため、関係省庁は共同で具体的な計画をとりまとめるとともに、その実施に当たってはバイオテクノロジー関係省庁連絡会議において密接な連携を確保することとしている。

生研機構からのご案内

生研機構では、ガット・ウルグアイラウンド農業合意関連対策として、農業生産現場に直結した新技術の開発を、平成7年度から11年度までの5カ年の予定で、民間企業への委託により進めております。今日まで、4カ年が経過し、多くの成果がまとまりつつあります。

このような中で、既に完成した成果品を披露するとともに、改良途上の試作品について、生産者の方々、農業生産現場に関わりの深いの方々、ならびに関係行政機関の方々から、ご意見ご質問をいただき実用性を高めるため、成果説明会の開催を予定しております。

7月までの開催予定は次のとおりとなっております。詳しくは、当機構研究開発課までご連絡ください。

(Tel.03-3459-6568・Fax.03-3459-6577

E-mail:maruken@tokyo.brain.go.jp)

日 時	場 所	テ ー マ
5月25日(火) 13:30~	熊本市 KKRホテル熊本	放牧管理と畜産環境対策技術
6月4日(金) 13:30~	高知市共済会館	施設園芸・環境保全型栽培技術
6月18日(金) 13:30~	宮崎市宮日会館	施設園芸・環境保全型栽培技術
7月14日(水) 15:00~	長岡市 ニューオータニ長岡	大区画水田の自動水管理

#### 編集後記

平成11年度の第1号になります。本年度も、昨年度同様 BRAIN テクノニュースをよろしくお願いいたします。ダイオキシンなど化学物質による環境汚染が、様々な形で問題になっており、これに対し、生物の機能を利用した環境にやさしい対策について様々に研究が行われています。今回は、これらダイオキシン対策につきまして取り上げることにいたしました。東京大学生物生産工学研究センターの野尻先生、大森先生にはバイオレメディエーションと細菌によるダイオキシンの分解について。東京大学先端科学技術研究センターの軽部先生、野村先生には、バイオセンサーを利用したダイオキシンの測定について、更に、財団法人鉄道総合技術研究所の金原先生

には微生物による PCB の分解についてご紹介いただきました。

このほかにも、滋賀県茶業指導所の今村先生、志和先生にご紹介いただいた茶園排水の浄化処理とリサイクルなど、生物の機能を利用した環境対策への取り組みには様々なものがあります。これからも、折に触れ、様々な切り口から環境問題を取り上げていきたいと思えます。

さて、私事ですが、今回の編集に当たり、図らずも私の同級生二人を執筆者としてご推薦いただきました。前号で原田先生をご紹介させていただき記事を編集しながら、不思議な縁について改めて考えることとなりました。

(原田記)

## ブレインテクノニュース (第73号)

平成11年5月15日発行

編集兼発行者 眞木 秀郎

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒105-0001 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

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 1999