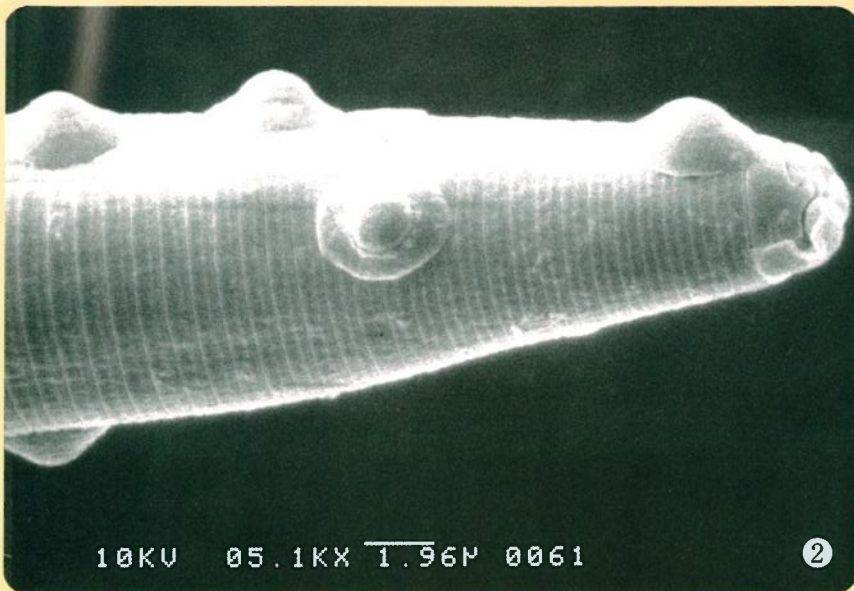


# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution



## 生物農薬

① 天敵農薬

ハモグリコマユバチ  
(*Dacnusa sibirica*) の  
成虫 (静岡県農試・西  
東 力原図)

② 微生物農薬

*Pasteuria penetrans*  
の胞子 (北海道農試・  
奈良部 孝原図)

目 次

巻 頭 言

- 21世紀への橋渡し…………… 1  
堤 英隆 (生物系特定産業技術研究推進機構理事長)

総 説

- 生物農薬—研究開発の現状と課題…………… 2  
鈴木孝仁 (生物系特定産業技術研究推進機構)

国内情報

- 生物農薬の製剤化技術の研究開発—ガット UR 対策研究開発成果から…………… 6  
田中宏樹 (生物系特定産業技術研究推進機構)
- 耐乾燥性, 耐塩性, 耐冷性を備えた遺伝子組換え植物の開発…………… 9  
篠崎和子 (農林水産省国際農林水産業研究センター)
- 作溝型簡易草地更新機の開発と実用化…………… 14  
山名伸樹 (生物系特定産業技術研究推進機構・畜産工学研究部)

地域の先端研究

- ニシキゴイのバイオテクノロジー…………… 18  
佐藤 将 (新潟県内水面水産試験場)

文献情報

- 凍結乾燥法を利用した精子の保存…………… 22  
Wakayama T. 他 (Nature Biotechnol., 16: 639-641, 1998)  
抄訳: 横尾正樹 (東北大)
- Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ペプチダーゼ遺伝子群の …………… 23  
*Lactococcus lactis* への導入と発現調製  
Wegmann U. 他 (Applied and Environmental Microbiol., 65(11):  
4729-4733, 1999) 抄訳 上野敬太 (カルピス(株)基盤技研)
- 単子葉植物と双子葉植物における葉の発生様式の比較に関する2つの研究報告…………… 24  
(1) Timmermans M.C.P. 他 (Science, 284: 151-153, 1999),  
(2) Tsiantis M. 他 (Science, 284: 154-156, 1999) 抄訳 木苗貴秀 (東京大)
- リパーゼを触媒とした構造トリグリセリド合成における最適反応の検討…………… 25  
Schmid U. 他 (J. Am. Oil Chem. Soc., 75: 1527-1531, 1998)  
抄訳 丸山一輝 (マルハ(株))
- イネいもち病菌の病原性機構に働く ATP-binding cassette (ABC) transporter …………… 26  
Urban M. 他 (The EMBO Journal, 18: 512-521, 1999) 抄訳 及川志保 (東北大)

海外便り

- DNA の引き算による病原性関連遺伝子単離の試み—カリフォルニア大学デービス校  
における一年間…………… 27  
竹原利明 (農林水産省農業研究センター)

特別情報

- ブレインテクノフォーラム「質的形質に関するゲノム解析の最前線—  
イネ・ヒト・家畜まで」概説…………… 31

表紙写真説明

生物農薬 ① 天敵農薬: 写真は, ハモグリコマユバチ (*Dacnusa sibirica*) の成虫で, トマトの害虫マメハモグリバエに対する天敵農薬として販売されている。② 微生物農薬: 写真は, ネコブ線虫の虫体表面に付着している細菌 (*Pasteuria penetrans*) 胞子の電子顕微鏡写真で, トマトの病害虫ネコブセンチュウに対する微生物農薬として開発されたもの。なお, 生物農薬に関する詳細は, 総説 (2頁) を参照して下さい。

## 21世紀への橋渡し

生物系特定産業技術研究推進機構  
理事長 堤 英 隆



新年あけましておめでとうございます。

懸念された2000年問題も大きなトラブルもなく平穩のうちに新年を迎えられたことは喜ばしいことであります。これら問題への対応を通じ、科学技術の持つ様々な側面について、考えさせられたところであり、改めて、我々の社会がいかに科学技術によって支えられているかについて、認識したところであります。

さて、私ども生研機構の関係する農林水産業・食品産業等を見回して見ますと、これまでの技術の蓄積を感じるとともに、長い助走を経て、今將に飛び立とうとしている技術も数多くあります。

昨年7月に食料・農業・農村基本法が成立し、日本農業の再生に向けた新しい取り組みがスタートいたしました。バイオテクノロジーをはじめとする革新的な技術は、農林水産業の生産力の飛躍的な向上と新たな展開を可能とし、21世紀の社会経済に大きな変化と豊かさをもたらすものと期待されています。また、これらの技術は、世界的な食料・環境・エネルギー問題などを解決する上からも大きな期待が寄せられています。

近年、イネゲノム、ヒトゲノムを始めとしてゲノム解析は急速に加速されてきており、これらの中から有用遺伝子の発見など様々な成果が期待できます。更に、これら成果を活用した多収性、耐病性、耐虫性の作物、乾燥・塩害などのストレスに強い作物の作出、畜産分野では体細胞クローン技術を利用した改良増殖などのほか、家畜を通じた有用なタンパク質の製造などが期待されています。また、機能性食品、低アレルギー食物の開発、HACCP

の導入など、食品産業においても様々な技術が求められています。

生研機構のもう一つの柱である農業機械化の促進は、国際化や担い手の減少・高齢化が進む中、農産物の生産コストを引き下げ、過重な労働負担の軽減、更には環境問題への対応を図る上で極めて重要な業務となっています。

生研機構においては、これまでも、出融資事業を通じて民間の研究開発を支援するほか、新技術・新分野の創出をめざした基礎研究を推進してきましたが、今年度の補正予算では、若手研究者支援型の基礎研究を開始するとともに、新年度からは新たに総理提唱のミレニアムプロジェクトの一環として、産学官の研究勢力を結集しつつ、バイオテクノロジーの産業化に向けた研究開発に取り組むこととしています。また、農業機械化促進業務では21緊プロ事業の中で環境関連分野の研究開発が拡充されました。更に、UR対策として取り組んできた農業に関する研究開発事業は今年度をもって終了し、今後は成果の評価・分析及び生産現場への普及に努めることとしています。

21世紀への橋渡しとなる節目の年に当たり、生研機構としても産学官の連携の下、決意を新たにバイオテクノロジーなどの先端技術及び農業機械化を両輪とする研究開発の一層の進展に全力を挙げていく所存でありますので、今後とも関係の皆様のご支援、ご協力をお願いします。

Tsutsumi Hidetaka

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3-18-19

◀総説▶

## 生物農薬 — 研究開発の現状と課題 —

生物系特定産業技術研究推進機構

鈴木 孝仁

農作物の栽培するにあたって、病気や害虫を制御しなければ、作物としての収穫は望めないし、農業経営は成り立たない。病虫害の防除や雑草対策には主として化学合成農薬が使われているが、環境負荷のすくない、より安全性の高い農業資材としての生物農薬が注目されている。環境保全型農業を推進する中での生物農薬の役割について紹介する。

### 1. はじめに

21世紀を目前にしたいま、人は環境と調和しながら生きていかなければならない。環境に配慮なしには産業は成立しないし、日常の社会生活もなりたたない。農業においては、安全性と安心度の高い農産物が消費者から強く求められていると同時に、生産者、行政側は環境を保全しながら、食料生産を持続的に確保するいわゆる環境保全型農業の推進を積極的に進めている。環境保全型農業は、自然の物質循環機能を発揮させながら適地適作、輪作、適切な施肥、総合的病虫害防除等を行い健全な作物の育成を基本とし、持続的に農業生産することである。しかし、ヒトは健康に配慮していても病気に罹りクスリを飲むと同じように、作物も病虫害や雑草害を受けるため、その対策を講じる必要がある。

### 2. 総合的有害生物管理 (IPM) とし ての生物農薬

病虫害防除や雑草駆除の手段として、これまで効果の顕著な化学合成農薬が主として使われてきた。しかしながら出来るだけ環境負荷を少なくし、より安全性が高く環境に優しい病虫害・雑草対策として総合的有害生物管

SUZUI Takahito

〒105-0001 港区虎ノ門3-18-19マリビル10F

理 (IPM) が重要視されてきた。IPMは、病虫害の発生予察の活用、耕種的に病虫害の発生を少なくするような栽培方法の選択、湿度や光などを利用した物理的な手法の利用、抵抗性品種や台木を利用した生物的な手法、あるいはフェロモン、植物の抵抗性を誘導する化学的手法など総合的に病虫害、雑草害を経済的レベル以下に制御し、できるだけ化学合成農薬の使用を少なくしようするものである。この中で環境に配慮した生物的防除手段の一つとしての生物農薬があり (図1)、注目を集めている。例えば、99年9月に開催された日本植物防疫協会主催の生物農薬のシンポジウムには、700名の参加があり関心の高さが伺われた。

### 3. 生物農薬とは

生物農薬とは、生きた生物そのもの、あるいは生物の抽出物を有効成分とし、病虫害や雑草に直接あるいは間接的に作用させる農薬をいう。具体的には、捕食性昆虫、捕食性ダニ、ウイルス、拮抗微生物、昆虫寄生性線虫などがある。但し、フェロモン、抗生物質などは合成農薬に準じて取り扱われている<sup>1)</sup>。日本ではじめて生物農薬が登録されたのは1954年タバコ白絹病を対象としたトリコデルマ生菌剤で、世界的にも先駆的なものである。しかし、対象病害である白絹病の発生は年次変動が大きく、かつ発生にむらが多いこと、適



図1 環境保護型農業，IPM（総合的有害生物管理）と生物農薬の関係

用作物がタバコであることからその適応範囲は極めて限られたものとなっている。その後、拮抗微生物、弱毒ウイルス、天敵利用など各種の研究が行われたが、生物農薬の実用化には、長い期間を要した。1982年にアブラナ科野菜のアオムシ、茶のチャノコカクモンハマキなど広い害虫に効果のあるBT剤 (*Bacillus thuringiensis*)、1989年にバラ・根頭がん腫病にアグロバクテリウム・ラジオバクター剤 (*Agrobacterium radiobacter*) が登録され、生物農薬の本格的利用が開始された。近年、ヨーロッパにおける活発な天敵利用に刺激されて外来天敵の導入が活発となり、生物農薬は1999年6月現在、微生物農薬として11種、35銘柄、天敵農薬として8種14銘柄が登録されている<sup>2)</sup>。

#### 4. 微生物農薬と天敵農薬

微生物農薬では、ハクサイ・軟腐病に非病原性細菌 *Erwinia carotovora*、ナス・灰色かび病に細菌 *Bacillus subtilis*、トマト・ネコブセンチュウに細菌 *Pasteuria penetrans* (写真1)、コウライシバ等の雑草スズメノカタビラに対し細菌 *Xanthomonas campestris* pv. *poae*、シバ・シバオサゾウムシやコガネムシ類に対し線虫 *Steinernema carpocapsae*、*S. kushidai* が、クワ・キボシカミキリに糸状菌 *Beauveria bassiana* などがある。天敵農薬では、イチゴ等・ハダニ類にチリカブリダニ、トマト等・オンシツコナジラミに対しオンシツツヤコバチ、ナス等ミナミキイロアザミウマ

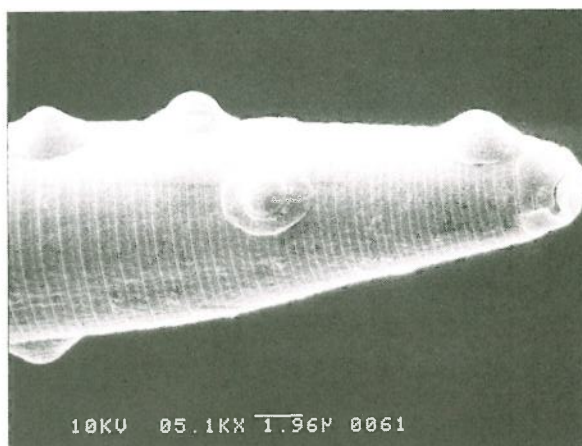


写真1 トマト、キュウリ等に寄生するネコブセンチュウ2期幼虫の体表面に付着した *Pasteuria penetrans* の孢子。(走査電子顕微鏡写真，北海道農試畑作研究センター：奈良部 孝氏提供)

に対しクメリスカブリダニ、トマト・マメハモグリバエに対しハモグリコマユバチ、イサエアヒメコバチなどがあり、次々と登録されている。さらに、現在農薬登録に向けて数多くの生物農薬資材が公的試験を実施中であり、数年内にその数は増大すると予想される。特に注目したいのは、これまで外国産の天敵導入が主であったのが、生態系の維持の関係から在来天敵の利用が積極的に検討され、その登録のための試験が進められている (写真2)。

#### 5. 生物農薬活用の体系づくり

このようにIPMを行うにあたって重要な素材である各種の生物農薬が市場に出回ることにより、これまで単発的な利用であったものが、各種生物農薬を組み合わせることによっ



写真2 トマトなどを侵すマメハモグリバエの寄生蜂・ヘミプタルセヌス・バリコルニス *Hemiptarsenus varicornis* の雌成虫（在来天敵で生物農薬としての登録試験中）、写真はトマト葉中のマメハモグリバエ幼虫（葉中の白色部分）に産卵しているところ。（静岡県農業試験場：西東 力氏提供）

て、化学農薬の使用回数を減じることができる。減農薬が社会的に強く要求されている背景から、これら生物農薬の活用により少しでも化学合成農薬を減らしていく体系づくりの試験がさまざまな作物の各種病害虫を対象に実施され、IPMに向けて着実にデータが揃いつつある。例えば、施設メロンの主要害虫に対して、定植時にイミダクロプリド粒剤を処理し、薬剤の効果が消失する栽培中期以降に、ワタアブラムシにアブラバチ（3回）とクサカゲロウ（3回）の放飼、シルバーリーフコナジラミに対してオンシツツヤコバチの3回の放飼で薬剤防除区と同等の防除効果を得られている<sup>3</sup>。また、施設トマトでは、イミダクロプリド粒剤、フルフェノスクロン剤（昆虫生育調節剤）の化学農薬と、微生物農薬のBT剤を組み合わせた系にイサエアヒメコバチ、ハモグリコマユバチ、オンシツツヤコバチの

天敵利用で、マメハモグリバエの密度を慣行防除区より低く抑え、マメハモグリバエに対する農薬の散布を慣行栽培の半分にすることができた<sup>4</sup>。

## 6. 生物農薬の生産と農家の利用状況

現在登録されている生物農薬は49件で全農薬登録件数5,369の0.9%である、また、平成10年度における生物農薬全体の出荷量は119tで、全農薬の0.03%を占めるに過ぎず、生物農薬の出荷金額23億円は全農薬出荷金額の0.6%と微々たるものである。しかしながら、生物農薬の利用を出荷金額で見ると前年の2.5倍に増加している<sup>5</sup>。特に天敵農薬は新しく登録された品目が多いことからその利用は急速に伸び、今後ますます利用されていくことが予想される。

生物農薬の使用状況について農家を対象とした調査<sup>6</sup>によれば、露地野菜での生物農薬使用農家数割合は5.9%、生物農薬使用回数は3.4回、施設野菜ではそれぞれ3.0%、2.9回となっている。また、農業改良普及センターを対象として調査した生物農薬の利用<sup>7</sup>は、施設野菜では、生物農薬利用を100%とした場合、一般的な技術として幅広く普及している5.2%、ある程度普及しつつある12.0%、先進的事例として取り組みがみられる31.3%、今後普及する可能性がある22.5%、ほとんど行われていない25.4%であり、普及しつつあることが伺える。

## 7. 環境と調和した農業と生物農薬

FAO, WHOの傘下のコーデックス委員会では、厳格な有機農産物（オーガニック食品）の規定で、認証組織または公的機関による承認のもとに植物の病害虫防除剤として生物農薬の使用が認められる動向にある<sup>8</sup>。これは有機農産物生産の現場においては病害虫・雑草対策として有効な手段となり、より優れた品質の農産物が消費者へ提供できることから大きな意味がある。

これからの農業生産における病害虫・雑草防除はIPMの推進が必須条件であり、この中において生物農薬の占める位置づけは大きい。科学技術庁・科学技術政策研究所の技術予測調査研究チームの報告によれば「生物農薬が病害虫防除の主体となった防除体系が普及する」のは、2008年と予測しており、環境と調和した持続可能な農業生産活動の例とし、これからの普及が期待される<sup>9)</sup>。

## 8. おわりに

これらの期待に応えるためには、生物農薬に関わるさらなる研究開発が求められる。すなわち、生物農薬の素材の開発、生物農薬とその他の技術含めた体系化、生物農薬を含むIPM実施例とその解析情報のデータベース化とその利用法の開発が必要となろう。研究開発の中で、製品価格と作業効率に関わるコスト問題は重要であり、この面での一層の改善が望まれる。さらに、生物農薬により生産された農産物の販売戦略についても、一層の改良

の余地があろう。これらを含む技術開発が安全な農産物を効率よく生産でき、農業経営を安定させ、これにより消費者に安全と安心をあたえることができる。

## 文献

- 1) 日本植物防疫協会：農薬ハンドブック p.129, 1994
- 2) 木村茂：生物農薬の登録，シンポジウム生物農薬 その現状と利用，日本植物防疫協会・日本バイオリジカルコントロール協議会 27-33, 1999
- 3) 柏尾具俊：第3回 IPM パネルディスカッション 44-47, 1999
- 4) 小澤朗人：第3回 IPM パネルディスカッション 50-52, 1999
- 5) 日本植物防疫協会：農薬要覧 1999
- 6) 農林水産統計速報 11-159, 農水省統計情報部 (H11. 8 .25.), 1999
- 7) 農林水産統計速報 11-161, 農水省統計情報部 (H11. 8 .25.), 1999
- 8) コーデックス委員会：食品に関する委員会，環保研連ニュース 109, 1998
- 9) 科学技術庁・科学技術政策研究所・技術予測調査研究チーム：第6回技術予測調査，NISTEP Report 52, 1997

◀国内情報▶

## 生物農薬の製剤化技術の研究開発

—ガット UR 対策研究開発成果から—

生物系特定産業技術研究推進機構

田中 宏樹

生研機構では、ガットウルグアイラウンドの農業合意関連対策として、平成7年度から11年までの予定で稲作、畜産、園芸、畑作などの分野で87の研究開発テーマについて、生産現場に直結する技術開発を進めてきた。87テーマのうち4テーマはいわゆる生物農薬の製剤化技術の開発である。ここにその開発成果2事例を紹介する。

### 1. シュウドモナス菌混合育苗培土による土壌病害防除

シュウドモナス属細菌の2種類を利用することによって、臭化メチルやクロロピクリンによるくん蒸以外に有効な防除方法がない土壌細菌病害。トマト青枯病の防除に目途をつけた(図1)。

#### (1) 植物内生細菌

トマト及びサンショの根から分離したシュウドモナス・フルオレッセンス細菌の2菌株(主剤菌)をセル成型育苗用の培土に混合し、この培土でトマトを育苗すると、発根と同時に主剤菌が根表面及び根内に侵入して、増殖し、青枯病に対する抵抗性が誘導される。主剤菌はトマトの皮層細胞の間隙に生息している。2種の細菌が共存すると、根内への潜伏寄生が容易になり、根内定着度も高くなる。主剤菌の根内生育能を検定する手法を開発して、根内生育能を維持させた培養法、一次代謝を抑制した大量培養法も確立できた。

#### (2) 土壌病害防除と効果的な使用法

トマト青枯病に対する発病抑制効果は、ほ場の病原菌密度によって左右される。自根無処理苗の収穫期における発病株率が30%程度以下のほ場であれば、主剤菌育苗培土利用のみのトマト自根苗でほぼ完全に発病を抑制す

TANAKA Hiroki

〒105-0001 港区虎ノ門3-18-19

ることができる。

主剤菌育苗培土を使用したトマト自根苗、接ぎ木苗の育苗技術を確立して、トマト青枯病およびトマト根腐いちよう病を対象とした現地および広域試験を実施し、栽培時期及び期間、発病度、経済性に応じて主剤菌の単用処理、主剤菌と抵抗性台木及び土壌消毒などの組み合わせ処理方法に目途を得ている。

日本植物防疫協会に委託したトマト青枯病防除効果試験で、「実用性あり」の判定を得て、99年4月に農薬登録申請の手続きを開始した。またトマト根腐いちよう病に対する防除効果試験を進めるとともに、主剤菌と他細菌株との併用によるハクサイ根こぶ病防除効果試験を実施している。

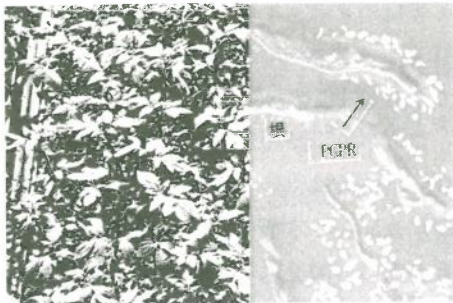
さらに、植物保護資材を種子コーティング用資材と他用途に適用できる水和剤に加工した。後者の果菜類の摘芽跡処理、ばれいしょ種いもの植え付け後腐敗防止試験およびタマネギの貯蔵時腐敗防止試験を兵庫県内で実施して良好な結果を得た。

#### (3) 植物成長調整効果と

##### その効果的な使用

主剤菌育苗土利用のトマトでは、セル苗の保存性を利用した移植時期調整と定着苗の特性を利用した栽培によって、早期収穫および収穫時期の延長が可能となった。アブラナ科作物では、育苗中のわい化による苗の保存性、機械移植への適用性および本圃定植後の生育促進などについて農家は場で実証した。日本





蛍光性細菌がトマトの根の中に入ったり、根の周囲に付着している様子(右)とそのトマト苗(左)



図1 蛍光細菌(シュドモナス菌)による土壌病害防除

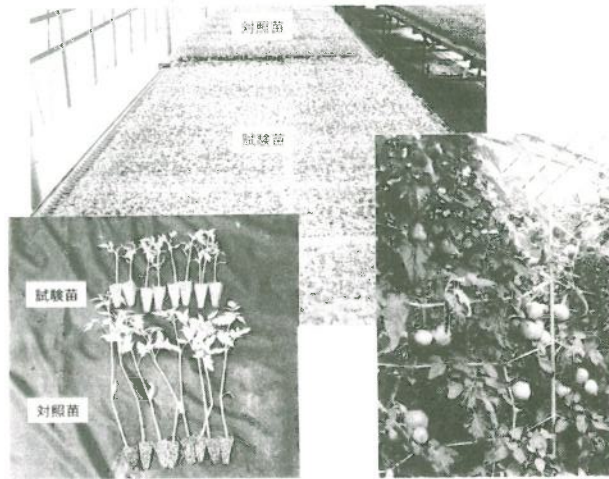
植物調節剤研究協会に委託したトマトセル育苗時の徒長防止に関する適用性試験で「実用性あり」と評価されている。この効果は移植適期のステージにまで生育した苗が、天候の影響で移植できなくても、トマトでは1ヶ月以上の間、セル苗の状態でも保存できるという画期的な新技術に発展すると期待されている。

(4) 品質管理と安全性

パイロットプラントを建設し、これによって大量生産、製剤化した主剤菌育苗培土のトマト青枯病抑制効果は、常温管理で1年間は安定、また流通段階の安全性確保にも目途を得ている。ヒトに対する安全性、環境生物、作物への影響試験で、安全性や影響に疑念は生じていない。

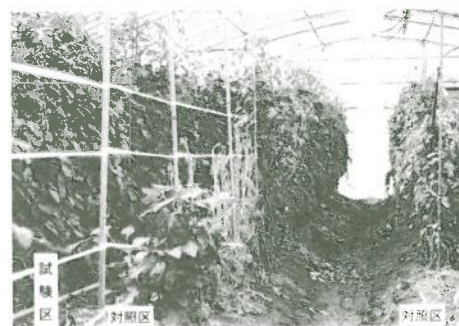
(5) 効果と普及

量産時の製品価格は、1袋2～4千円となる見通しで、10aあたりでは20～40千円程度となる。これは抵抗性接ぎ木苗の場合の100～200千円、臭化メチルによる土壌薫蒸の場合30kgの使用で300千円程度となることと比較しても導入の経済効果は高い。

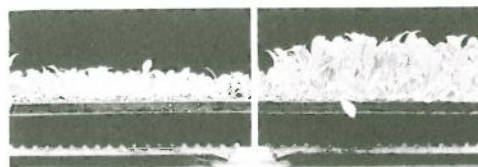


セル育苗時徒長防止効果

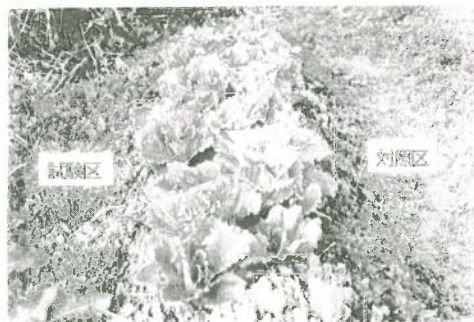
試験苗の本圃生育



トマト抑制栽培での現地圃場試験(H8年10月)



レタスのセル成型育苗(播種後28日)(左:シュドモナス培土, 右:一般培土)

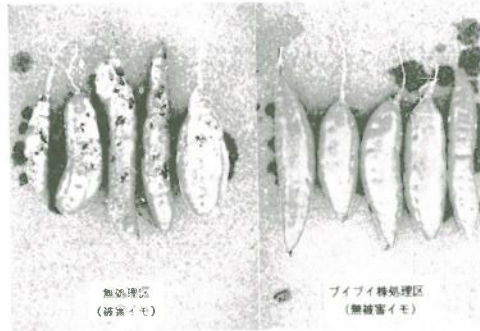


レタスの定植後の育成状況(定植後35日)(左:シュドモナス培土育苗, 右:一般培土育苗)

本成果は、土壌病害防除機能と生育調整機能を併せ持つ画期的な生菌資材であり、11年度中にトマト青枯病防除剤として農薬登録を申請し、その後成長調整剤として順次適用拡大を行う予定である。



生物農薬（ブイブイ株）で死亡して小さくなったコガネムシ幼虫（上）と健康なコガネムシ幼虫（下）



生物農薬（ブイブイ株）によるコガネムシ防除区のサツマイモ（右）と無処理区のサツマイモの被害状況

図2 天敵細菌（BT ブイブイ菌）の利用

## 2. 天敵細菌 BT ブイブイ菌の利用

### (1) 成果概要

我が国の土壌から分離された *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis strain Bui-bui (BT ブイブイ株、仮称ブイハンター) は、かんしょ等の害虫であるコガネムシ類に特異的に高い病原性があり、ドウガネブイブイ、ヒメコガネ、マメコガネなど11種のコガネムシ類を死亡させる。培養条件が他のBtと異なるようで、大量生産技術の研究に時間を要していたが、培地の基本組成を固め、培養の規模拡大を進めている。単位重量当たりの粒数を増やした小型粒状製剤は土壌中における均一分散が良く、防除効果が高いため、商品形態

として粒剤を考えている。春の耕起・畝立時に10アール当たり、全面施用は20kg、畝間施用であれば10kgで防除効果試験を行ってきた。コガネムシ類の幼虫の発生は7月以降であり、本剤の施用から対象害虫の発生までの期間が長いですが、本剤は化学合成農薬より防除効果が高い（図2）。

日本植物防疫協会に委託したかんしょコガネムシ類防除効果試験で、「実用性あり」の判定を得ている。ヒトに対する安全性試験、ウズラ、マガモ、ニジマス、オオミジンコ、カイコに対する影響試験で、安全性に疑念は生じていない。

### (2) 効果と普及

現行のアドバンテージ粒剤などの化学合成農薬とほぼ同等の価格となる見込みで、11年度内にかんしょのコガネムシ類防除剤として農薬登録申請する予定である。当面は鹿児島、千葉、茨城などの生食用かんしょ栽培地帯への普及を期待するが、順次、さといも、落花生、いちごなどへの適用拡大を行うとともに、剤型を安価な剤型とすることも考えている。

## 3. さいごに

ガットUR対策の中での、生物農薬関連の4研究テーマについては、いずれも効果試験、安全性試験をほぼ終えており、平成11年度内の農薬登録申請完了に向け、急ピッチで成果のとりまとめが行われているところである。

うち、温室害虫アザミウマに有効なククメリスカブリダニ「商品名：ククメリス」は、平成10年から商品化に移っており、他の開発成果などとも併せ、生物農薬の品揃えと相まった普及の拡大が大いに期待されると思われる。

## ◀国内情報▶

耐乾燥性、耐塩性、耐冷性を備えた  
遺伝子組み換え植物の開発農林水産省 国際農林水産業研究センター  
篠崎 和子

地球レベルの環境劣化から環境ストレス耐性植物の開発が重要な課題となっている。植物は干ばつ・塩害・低温等の劣悪環境状態になると種々の耐性遺伝子を働かせることで環境に適応している。これらの耐性遺伝子群の働きを調節する転写因子と呼ばれる蛋白質の遺伝子を突き止めた。この遺伝子を改変した植物は、これまでにない高いレベルの乾燥・塩分・凍結耐性を示した。この技術は種々の植物に応用できると考えられ、地球規模の環境劣化に対応できる作物や樹木の開発への応用が期待される。

## 1. はじめに

熱帯雨林の破壊、温暖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おり、アフリカ等の開発途上国をはじめとする世界の多くの地域で緑地の砂漠化が問題になっている。また、開発途上国での人口増加は爆発的であり、21世紀半ばには世界の人口は100億に達すると考えられている。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国際的に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開発は、その耐性機構が充分解明されていなかったため、病害虫耐性作物等に比較して遅れているのが現状である。しかし近年、遺伝子レベルの研究が進むにつれて、この分野も大きな進展を遂げている。本稿では乾燥・塩害・凍結等の環境劣悪地に対応できる植物の分子育種を目指す当研究グループの研究を紹介する。

2. 遺伝子組換え植物と  
環境ストレス耐性

1980年代に植物に遺伝子を導入する技術が開発され、作物の品質や収量を向上させる分子育種研究に活発に利用されるようになった。

YAMAGUCHI-SHINOZAKI Kazuko

〒305-8686 つくば市大わし1-2

1990年代後半には、遺伝子組換え植物は実際に農地で栽培されるようになり、農業生産の増産や安定化に大きな成果を上げるまでに発展した。病害虫や農薬耐性作物、過熟しないトマト等すでに商品化され、実用化に成功している。これに対して、環境ストレス耐性作物はその耐性の獲得機構が複雑なため、開発が遅れている。この技術開発のためには、植物の持つ環境耐性機構を分子レベルで明らかにするという基礎研究が重要である。

植物は自由に移動できないため、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。私たちは植物を取り巻く環境因子のうち特に乾燥を選び、乾燥に対する植物の耐性機構に着目して研究を行っている。乾燥にさらされた植物を調べてみると、乾燥に対抗して種々の耐性機構が働いていることが示された。この耐性機構を高めることにより、植物の耐性を上げることが考えられる。最近の研究から、この耐性機構で働いている多数の乾燥耐性遺伝子が明らかにされてきた<sup>1)</sup>。

## 3. 乾燥耐性遺伝子群

私たち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

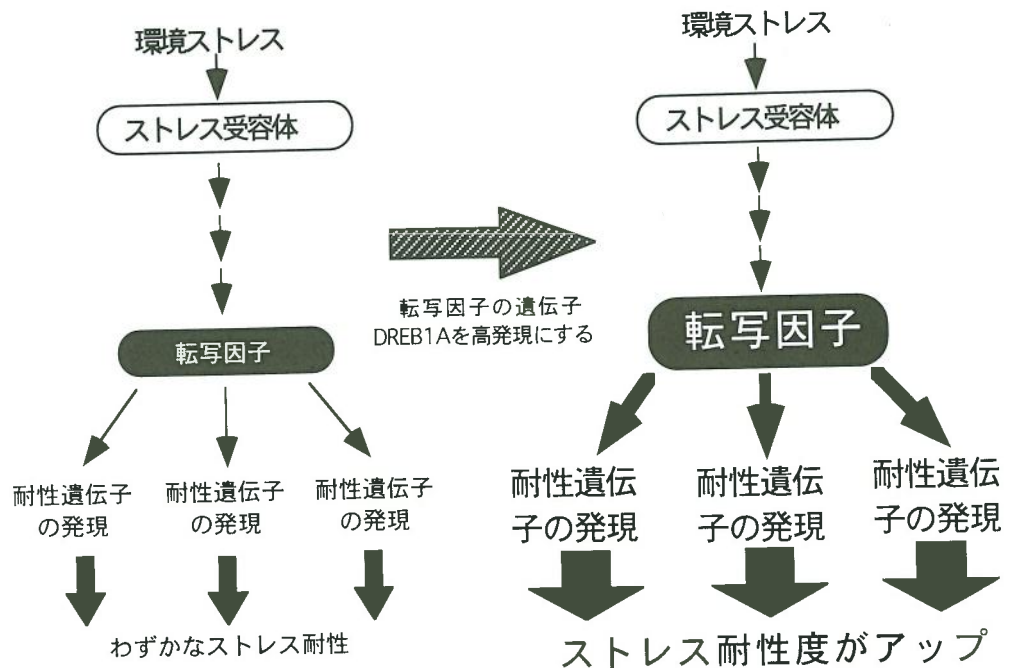


図1 植物のストレス耐性を上げるための戦略  
環境ストレス耐性遺伝子群の発現を制御している  
転写因子の遺伝子DREB1Aを高発現にすることにより、同時に複数の耐性遺伝子の発現量を上げて  
ストレス耐性をアップする。

されている乾燥耐性な豆科の作物であるカウピーである。もう一方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、ゲノムサイズが植物のなかで一番小さく、最も分子レベルの解析が進んでいる。

乾燥耐性機構で働く遺伝子のcDNAをシロイヌナズナから36種類、カウピーから10種類をクローニングした。これらの遺伝子群の機能には非常に多様性があり、その遺伝子産物群の協同作用により、乾燥から植物細胞が保護されていると考えられる。これらの遺伝子産物には水の細胞内輸送を行う水チャンネルタンパク質や変性タンパク質を再生するシャペロン、高分子物質の保護タンパク質であるデハイドリン、適合溶質である糖やプロリンの合成酵素等多数が挙げられる。

ドイツや米国には、乾燥に対して特別な耐性を示す復活植物やアイスプラントを用いて、乾燥時に働く遺伝子の研究を行っているグループがある。これらの植物を用いた場合も、私たちの研究グループと同様の乾燥耐性

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、単離した環境ストレス耐性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、ベ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植物を作出した研究などがある。しかし、これらの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、耐性機構に参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。

#### 4. 乾燥・塩・低温耐性遺伝子群の働きを制御する転写因子の遺伝子

乾燥耐性には多くの遺伝子群が関与しており、一つの遺伝子を改変しただけでは十分な耐性を付与できないことが明らかになった。

私たちは、耐性を獲得するために働く複数の乾燥耐性遺伝子群を同時に改変できれば、強い耐性を植物に付与することができると考えた。そのためには、複数の乾燥耐性遺伝子群の発現を制御する転写因子と呼ばれている制御因子の遺伝子を明らかにして、これを改変すればよいと考えられる(図1)。

これまでに単離した乾燥耐性遺伝子のうち、

デハイドリンをコードしている rd29A と名付けた遺伝子は、乾燥の他塩や低温によっても誘導され、種々の環境ストレス耐性の獲得に働きを示した。この遺伝子がストレス時に選択的に機能するのは、この遺伝子のプロモーターと呼ばれる制御領域に 9塩基からなる DNA 配列(シス因子:DRE)が存在するためであることを明らかにした<sup>2)</sup>。さらに、酵母の

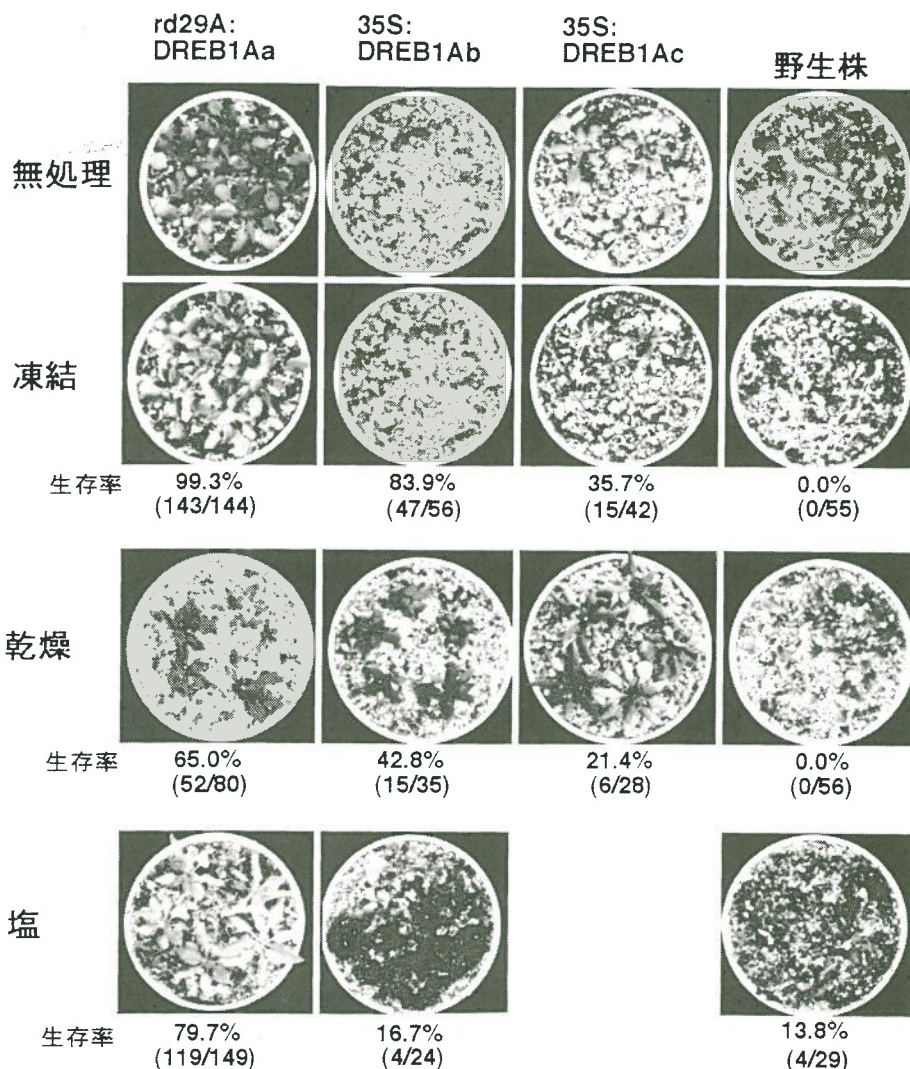


図2 耐乾燥性、耐塩性、耐冷性をそなえた遺伝子組換え植物

乾燥・塩・冷結耐性遺伝子群の働きを制御する転写因子をコードする DREB1A 遺伝子を、ストレス誘導性の rd29A プロモーター (35S:DREB1A) または一般的に用いられる CaMV35S プロモーター (35S:DREB1A) と結合して、シロイイナズナに遺伝子導入した。どちらの遺伝子組換え植物も高いストレス耐性を示したが、CaMV35S プロモーターを用いた場合は植物が矮化した。しかし、rd29A プロモーターを用いると野生株と同様の成長を示した。

凍結処理：-6℃で2日間凍結させた。

乾燥処理：2週間水を止めた。

塩 処理：海水と同じ濃度の食塩水に2時間浸けた。

括弧内の数字はストレス処理実験に用いた生存植物数/処理植物数を表す。

ワンハイブリッドスクリーニング法と呼ばれる新しい遺伝子クローニング技術を用いて、このシス因子に結合してストレスによる遺伝子の発現を制御している転写因子の遺伝子(DREB1A)をシロイヌナズナより単離した。この転写因子は少なくとも10種以上の乾燥、塩、低温耐性遺伝子群の発現を制御していることも明らかにした。

そこで、この転写因子の遺伝子を強く発現するように改変し植物に導入して、複数の耐性遺伝子の発現を変化させる実験を行った<sup>3)</sup>。遺伝子はその遺伝情報のコード領域だけを導入しても働きを示さない。この遺伝子の発現を制御するプロモーターを結合してこれを植物に導入する必要がある。これまでの植物の遺伝子組換えでは、多くの場合カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターが使われてきた。このプロモーターは結合して導入

した遺伝子を植物のどの組織でも強く発現させる性質を持っている。この35Sプロモーターに単離したDREB1A遺伝子を結合して、シロイヌナズナに導入した。18種類の遺伝子組換え植物を解析したところ、どの植物も乾燥や塩や凍結耐性を示した(図2)。しかし、どの植物も成長阻害が見られ、耐性度の高い植物ほど強い成長阻害が観察された<sup>4)</sup>。

### 5. 環境ストレス応答性プロモーターの活用

DREB1A遺伝子を導入した植物は高い耐性は得られるが、成長に対してはマイナスに働き強い成長阻害がみられるため、このままでは実用的な環境耐性植物が作出できない。そこで、私たちはストレス条件下で特異的に遺伝子の働きを調節するプロモーターに着目

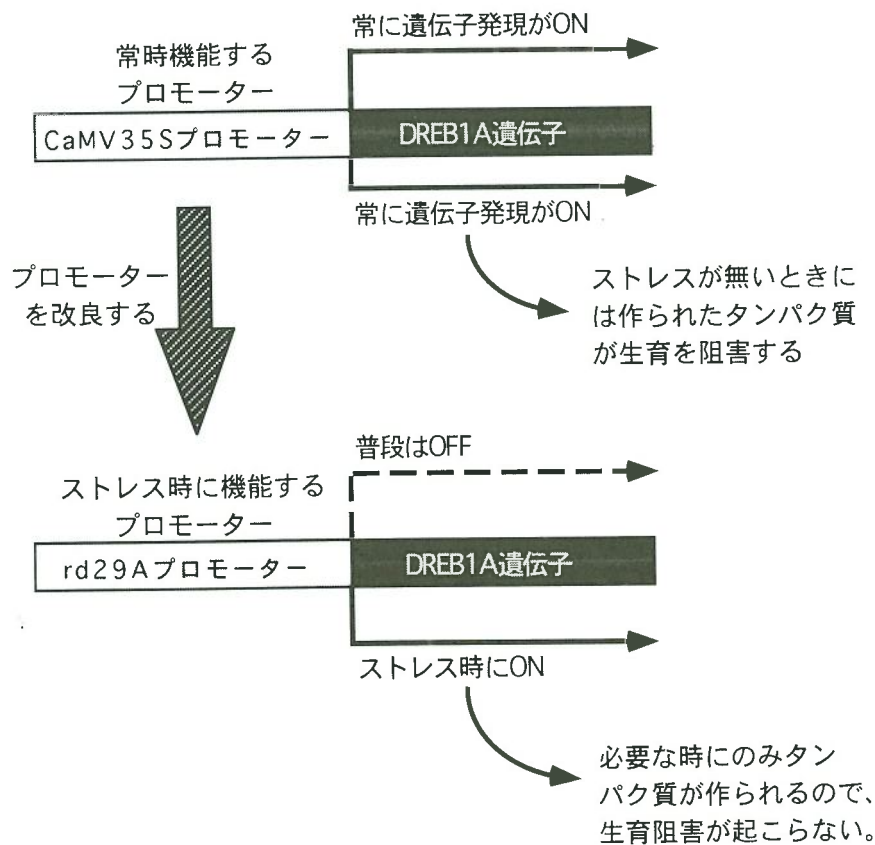


図3 環境ストレス応答性プロモーターの利用  
DREB1Aの様な強い環境ストレス耐性の制御因子の遺伝子を常時機能する35Sプロモーターと結合して遺伝子導入すると、常に遺伝子発現がONになり植物の生育が阻害される。35Sプロモーターのかわりにストレス時に特異的に機能するrd29Aプロモーターを用いると植物の生育阻害が見られなくなる。

した(図3)。DRE配列を持つrd29A遺伝子のプロモーターは乾燥の他、塩や低温による遺伝子発現を制御している。これらのストレス状態になると、その下流に存在する遺伝子を短時間のうちに非常に強く発現させる特徴を持っている。このrd29AプロモーターにDREB1 A遺伝子を結合して植物に導入した。48個体の遺伝子組換え植物を解析した結果、どの植物もこれまでにない高いレベルの乾燥、塩、低温耐性を示した(図2)。さらに、ほとんど成長阻害は見られなかった<sup>4)</sup>。この植物のRNAを調製して耐性遺伝子の発現を調べると、ストレスの無い成長に適した環境では耐性遺伝子は働きを示さず、ストレスが与えられると強く誘導されてることが明らかになった。このように、rd29AプロモーターとDREB1 A遺伝子の組み合わせは、乾燥・塩・低温耐性植物の分子育種にきわめて有効であることが示された。

## 6. おわりに

私たちは主に実験植物であるシロイヌナズナを用いて研究を行ってきた。しかし、植物は進化の過程で陸上化したときにこのような耐性機構を獲得したため、どの陸上植物も類似した耐性機構を持っていると考えられる。

実際、乾燥応答性のシス因子であるDREはシロイヌナズナのみでなく、タバコや小麦やトウモロコシ等の遺伝子にも存在して同様の働きを示していることが明らかにされている。現在、私たちはrd29AプロモーターやDREB1 A遺伝子をタバコに導入して耐性植物の作出に成功している。さらに、乾燥、塩、低温に強いイネやマメ等の主要作物のほか、樹木にも応用していけると考え研究を進めている。また、私たちが用いている遺伝子は本来植物が持っている遺伝子であり、ストレス時のみ働きを示す様に調節していることから、遺伝子組み換え食物の安全性にも問題が無いと考えられる。今後は種々の作物に応用され、重要な技術とし発展することが期待される。こうした研究が人類の食料問題を解決し、地球環境の修復のために役立つことを願っている。

## 文献

- 1) Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.: *Plant Physiol.*, 115, 327-334 (1997)
- 2) Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.: *Plant Cell* 6, 251-264 (1994)
- 3) Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.: *Plant Cell*, 10, 1391-1406 (1998)
- 4) Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.: *Nature Biotechnology*, 17, 287-291(1999)

◀国内情報▶

## 作溝型簡易草地更新機の開発と実用化

生物系特定産業技術研究推進機構・畜産工学研究部

山名 伸樹

低収化した草地の収量回復のための草地更新作業を省力的にかつ手軽に行うことをねらいとして、ロータリ耕うん装置をベースに直刃とL刃を組み合わせた新たな作溝方式を採用した。草地の細幅部分耕（作溝）から追播・施肥、覆土・鎮圧までを1行程で行う作業機（簡易草地更新機）を開発した。そして、開発機による更新作業を行い、実用性を確認した。現在、開発機は農業機械メーカーにより市販化に移されている。

### 1. はじめに

草地の生産力は造成後の年数経過とともに一般的に低下する。土壌の理化学性の悪化、牧草自体の生理的活性の低下などに起因し<sup>4)</sup>、草種構成の悪化、牧草密度の低下、不良草の侵入等となって現れる。低収化した草地の収量回復の作業を草地更新作業と呼ぶ。草地更新の手法には、草地の全面耕起を伴う完全耕起法（完全更新）と全面耕起を伴わない簡易更新法（簡易更新）がある。完全更新は更新効果は確実である反面、コストが高い、更新時の草地の利用を中断せざるを得ない、追播牧草定着までの降雨等による土壌流亡の危険性が高い等の欠点が指摘されている。一方、簡易更新は完全更新のような欠点はないものの効果が不確実な場合がある等の理由から、草地更新の必要性は認められつつも、北海道においてすら遅々として草地更新が進んでいない現実も報告されている<sup>2)</sup>。

筆者らは、作業コストが安く、更新直後の降雨等による土壌流亡も少ない簡易更新法に着目し、トラクタ直装式のロータリ耕うん装置をベースにして草地の細幅部分耕と施肥・追播、覆土・鎮圧を1行程で行う簡易更新用の作業機を開発した。そして圃場試験を行いながら作溝部を中心に改良を加え、実用機へと発展させた。

YAMANA Nobuki

〒331-8537 大宮市日進町1-40-2

### 2. 研究の経緯と開発機の概要

簡易更新法にもいくつかの方法があるが、簡易更新による草地更新の効果をより確実なものとするためには、草地土壌の物理性改善と積極的な追播が必要になる場合が多いとの認識に立ち、草地の物理的処理（部分耕）に追播を組み合わせることとした。部分耕の方法として、ロータリ耕うん装置のフランジに板状の作溝刃（直刃）を取り付ける方式を考案し、播種装置、施肥装置および鎮圧輪を組み合わせて1行程で草地の更新作業を行う作業機の開発を進めた。そしていくつかの圃場試験を通して性能を明らかにした<sup>1)3)5)</sup>が、直刃のみで作溝を行うため、草地の条件によっては追播のための播種床を安定して作成できない場合があった。そこで、新たに直刃2枚とL字状に曲がった作溝刃（L刃）2枚を組み合わせてフランジに取り付けた方式の部分耕作業機を開発し、効果を実証するとともに<sup>6)7)</sup>（直刃とL刃を組み合わせて細幅の部分耕を行う方式を作溝型と呼ぶことにする）、更に良好な作業性を確保するため、直刃2枚とL刃4枚を組み合わせた作溝部へと改良し、作溝型簡易更新用作業機へと発展させた。

図1に開発した作溝型簡易草地更新機の外観（側面図）を、図2に同機の作溝部における作溝刃の組み合わせと溝形状を示す。2枚の直刃と4枚のL刃を組み合わせた作溝部により溝形状がT字状の細幅部分耕（作溝）を



行う。直刃は主として既存植生のルートマットの切断と草地土壌の膨軟化を行うとともに播種床に必要な土壌を掻き上げ、L刃は追播のための播種床のスペースを確保する。L刃の作用深さは直刃の作用深さが10cmの時4～5cm前後になるように設定している。作溝刃を取り付けたフランジの間隔は27cmで、1行程で8条の作溝を行うので作業幅は2.16mになる。作溝部の上部には施肥装置、および播種装置を搭載しており、これらの装置から繰り出された肥料および牧草種子は導管を通過して溝の中に落下する。溝の中に落下した種子等は攪拌チェーンおよび覆土ディスクで覆土・攪拌された後鎮圧輪で鎮圧される。鎮圧

輪は各条独立してバネで加圧し、溝の部分のみを鎮圧する。播種装置は1条当たり2つの繰出装置を持っているため、大粒種子と小粒種子、マメ科牧草とイネ科牧草の混播など、多様な追播形態に対応することができる。

作溝に必要な動力はトラクタのPTO軸から供給し、肥料および種子の繰り出しのための動力は接地駆動輪より供給する。

### 3. 開発機の性能と圃場試験<sup>9) 10)</sup>

#### 1) 開発機の性能

本機はトラクタの三点リンクに直装して作業を行う。適応トラクタは、草地の状態によ

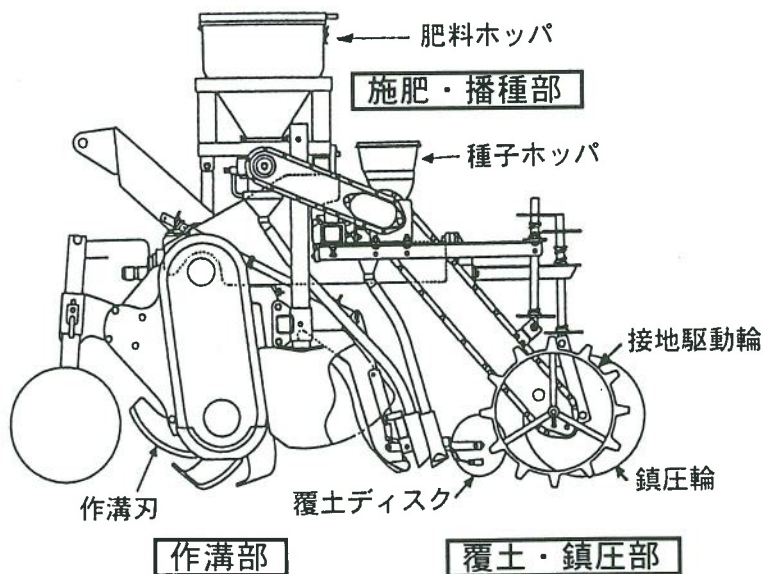


図1 作溝型簡易草地更新機の外観

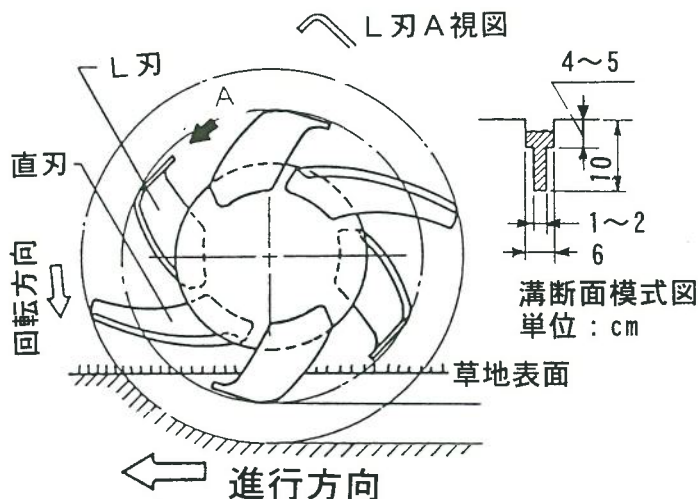


図2 作溝刃の組合せと溝形状

り異なるが、所要動力測定の結果から44kW (60PS)以上が目安である。肥料と種子の繰出しにはそれぞれ横溝スライド式ロール、丸穴式ロールを用いており、ほぼ設定どおりの肥料(市販粒状化成肥料)、種子を繰り出すことができる。51kW (70PS)のトラクタに装着して実施した生研機構内採草地における試験では、単位時間当たりの作業量約50a/h(作溝・追播時間および巡回時間の合計値と供試面積から算出)を得た。

## 2) 圃場試験

圃場試験の一例として、本機によるバヒアグラス草地へのイタリアンライグラス追播試験(図3は作業風景)の結果を表1に示した。この試験は暖地型牧草であるバヒアグラスにイタリアンライグラスを組み合わせることにより夏期はバヒアグラス草地、冬～春期はイタリアンライグラス草地として草地の通年利用を図ろうとしたもので、慣行ではイタリアンライグラスの追播をブロードキャストによる表面散播で行っている。慣行区は追播したイタリアンライグラスの定着が悪く収量がほとんどなかったのに対し、本機による試験区はいずれも良好な生育状況を示し、1回刈りで2 kg/m<sup>2</sup>を超える収量を得た。小山らが九州農試で実施した試験<sup>8)</sup>でも同様に良好な追播効果が報告されている。

## 4. まとめ

低収化した草地の更新作業用機械として作溝型簡易草地更新機を開発した。本機はロータリ耕うん装置をベースに作溝部を直刃とL刃を組み合わせて構成し、施肥・追播、覆土・鎮圧までの作業を1行程で行うもので、44kW以上のトラクタに装着して作業する。開発機は農業機械等緊急開発事業を経て松山(株)および小橋工業(株)によって市販化され、現在北海道から九州まで広い地域で利用されるに至っている。

## 5. おわりに

草地が低収化したら草地更新を行うというのが一般的であった。高品質粗飼料を確保するためには、草地を低収化させない積極的な草地管理も今後重要性を増してこよう。数年に1回、草地が低収化する前に優良草種の導入を行い、常に草地の状態を高位に維持できるような草地管理も本機を用いることにより可能になるのではないかと思われる。現に、ある軽種馬牧場ではそのような利用もなされている。新しい技術の展開にもつながればと思う。

表1 圃場試験結果例\*

	開発機による追播区 CDU区** 高度化成区**		ブロードキャスト散播 による慣行作業区**
播種量 (kg/10a)	1.6		1
施肥量 (kg/10a)	43	39	
1994.12.2調査			
立毛本数 (本) ***	70.8	69.2	19.4
平均草丈 (cm)	21.0	23.0	
1995.3.7調査			
生草収量 (kg/m <sup>2</sup> )	2.3	2.1	—
平均草丈 (cm)	49.0	46.4	—

\*: 鹿児島県南種子町での例。1994.10.27 イタリアンライグラス(タチワセ)を追播。1995.1.12に尿素を20kg/10aで全面散布。

\*\* : 開発機による追播区は同時工程CDU入り複合肥料(15-15-15)、高度化成(15-15-15)を設定40kg/10aで施用。慣行作業区は堆肥を散布。

\*\*\* : 開発機による追播区は溝1条・長さ1m当たり、慣行作業区は1m<sup>2</sup>の平均本数で示した。



図3 作業風景

なお、本稿で紹介した簡易草地更新機の開発研究と利用技術等を取りまとめた業績「作溝型簡易草地更新機の開発・研究と利用指針の策定・普及」は、平成10年度の日本草地学会賞を授賞した。

#### 謝辞

本研究を実施するにあたり、廣田秀憲前新潟大学教授、梅津頼三郎前九州大学教授、福山正隆前草地試室長（現九州大学教授）、小山信明前九州農試室長（現中国農試総研第2チーム長）、石黒潔大分県畜試前主幹（現大分県日田地方振興局課長）をはじめ多くの方々に貴重なご助言をいただきました。厚く御礼申し上げます。

#### 文献

- 1) 山名伸樹 他 (1985) 農機研報 19, 31-51
- 2) 島田実幸 他 (1987) 農機北支報 28, 31-35
- 3) 山名伸樹 (1987) 新しい技術 24, 農林水産技術会議事務局編, 235-241
- 4) 養賢堂 (1989) 粗飼料・草地ハンドブック, 229-236
- 5) 山名伸樹 他 (1989) 農機研報 23, 35-46
- 6) 山名伸樹 他 (1992) 日草誌 38 (別), 233-234
- 7) 亀井雅浩 他 (1994) 日草誌 40 (別), 135-136
- 8) 小山信明 他 (1995) 日草九支報 25 (1), 40-44
- 9) 山名伸樹 他 (1998) GRASSLAND SCIENCE 44(1), 30-37
- 10) 山名伸樹 (1999) 畜産の研究 53, 451-455, 養賢堂

◀地域の先端研究▶

## ニシキゴイのバイオテクノロジー

新潟県内水面水産試験場

佐藤 将

ニシキゴイでは1980年代半ばから、染色体操作技術いわゆるバイオテクノロジーの開発が行われてきた。ニシキゴイは観賞魚であるため、色彩に重点が置かれている。雌性発生では、極体型と卵割型という二つのタイプがあるが、それらは色彩の発現が異なっている。1998年になり、卵割型雌性発生および雄性発生によりクローンが作出された。今ではクローン等、染色体操作魚を使った育種法が検討されている。

### 1. ニシキゴイの歴史と現状

ニシキゴイはマゴイの突然変異種と考えられ、発祥の地とされる新潟県の山間部では、江戸時代文化・文政の頃（1804-1829）にはヒゴイやシロゴイを飼育し、これらの交配も行われていたようである<sup>1)</sup>。以来、度重なる交配を重ね、今では80種類以上の品種が誕生している。このように観賞魚として発展してきたわけだが、近年では海外での愛好家も増え、かなりの量が輸出されるようになった。こうしたことから新興生産国のニシキゴイ市場への参入も起こっている。

### 2. これまでの遺伝育種研究

岩橋は無地魚の体色（赤・白・黒・青・黄・光）の固定状況を把握するため、品種内で同系交配を行い、その体色・斑紋の出現状況を調査した。交配1代目の結果、体色が固定されているのは赤無地のみであり、その他の体色は分離の傾向を示した。また、多いもので5代目までの同系交配が繰り返されたが、固定できたものは青（浅黄）、黄、光であり、白無地同士の交配については、継代が進んでも赤色の出現があった<sup>2)</sup>。

紅白の作出には通常紅白同士の交配を行うが、その紅白出現率は60～70%程度であること

SATO Shoh  
〒940-1137 長岡市大川原町 2650

とが多い。岩橋・富田は紅白出現率向上を目的に、赤無地と白無地との交配を行ったが、期待した結果は得られず、その原因の一つに純系白無地が得られないことを挙げている<sup>3)</sup>。

体色発現の優劣については、松井<sup>4)</sup>、越田<sup>5)</sup>らの記述があるが、筆者らはマゴイ（黒）および光りもの（光）が他の体色に対して優性に発現することを把握している。このように多数の品種が存在しているニシキゴイであるが、その遺伝様式には不明な点が多い。

### 3. ニシキゴイにおける染色 体操作技術

魚類におけるバイオテクノロジーは染色体操作技術が中心であり、その原理や応用については和田<sup>6)</sup>、鈴木<sup>7)</sup>が総説しているので、ここでは詳しい説明は省く。遺伝様式の解明や形質の固定などの期待から、ニシキゴイにおいても1980年代半ば頃からバイオテクノロジー研究が始まった。他魚種同様、当初は雌性発生作出条件の検討が行われ、精液への紫外線照射による遺伝的不活化と低温処理による染色体倍数化処理が行われた<sup>8)</sup>。その後、マゴイでHollebecqら<sup>9)</sup>やKomarら<sup>10)</sup>が高温処理法を開発した。谷口<sup>11)</sup>はニシキゴイへの応用を行い、今では当試験場においても高温処理法を行っている。また、この高温処理法の採用により、これまで作出の難しかった第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出が可能と

なった<sup>12)</sup>。また、世界的にも例の少なかった、紫外線による卵核の遺伝的不活化と高温処理法による染色体倍数化処理を行うという雄性発生技術の開発も行われた<sup>13)</sup>。これらの手法の概略については、表1に示すとおりである。雌性発生では遺伝的に不活化された精子を使うわけであるが、ニシキゴイの場合、マゴイまたは光りもの（黄金等）を雄親魚に使用する。マゴイ・光りものの体色が優性であることを利用し、雌性発生誘導の成否のマーカーに使っている。雄性発生ではこの逆で、雌親魚にマゴイ・光りものを用いている。マーカーが体色であることから、その成否が一目瞭然である。

#### 4. 染色体操作魚の特性

雌性発生には第2極体放出阻止型（以下、極

体型）と第1卵割阻止型（以下、卵割型）という二つのタイプがあり、ニシキゴイではその色彩の発現に大きな特徴がある。紅白を親魚として用いた場合、普通交配（紅白×紅白）では赤無地・白無地・紅白が出現する。

極体型では普通交配と同様にこれら3種類が出現するが、卵割型では紅白の割合が極端に少なくなり赤無地と白無地とにほぼ分離してしまう（図1）。このように極体型と卵割型とは色彩で概ね判別が可能だが、卵割型の処理をしたのにも関わらず、極体型が生じてしまう事例がある。この場合、紅白出現率の極端な低下は認められない<sup>11)</sup>。このことから2型の雌性発生の確実な判別には、アイソザイムやDNA多型といった他のマーカーの利用が必要である。

また、極体型の特徴として紅白出現率が高くなる事例があることが挙げられ、2代目で

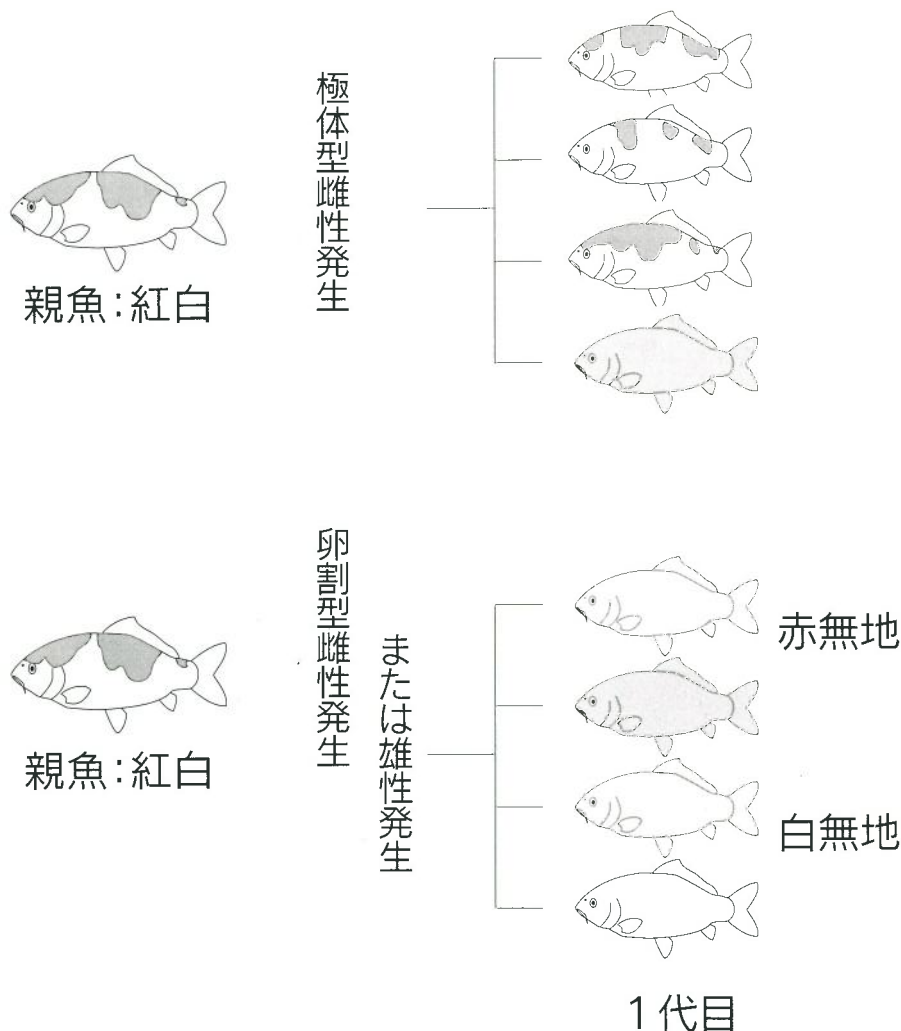


図1 ニシキゴイ紅白からの雌性・雄性発生出現品種

は、さらに紅白出現率が向上した事例もある<sup>14)</sup>。極体型を利用し作出された紅白群の平均赤色斑紋量とそれらの雌親魚の赤色斑紋量とは関連性が認められ、量的遺伝をすることが示唆された<sup>14, 15)</sup>。

これまでニシキゴイ生産者らの間では、クローン=コピーであり、品評会で優勝するような優良魚が大量にコピーされるのではないかという懸念が持たれていた。しかしながらクローンを得るためには、卵割型から2代目を作成しなければならない。この卵割型は、赤無地または白無地であるから、その子供であるクローンも赤無地または白無地にしかならないはずである。1998年、筆者らはニシキゴイクローンの作出にはじめて成功した。卵割型赤無地から2代目を作成し、クローンを得たのである。このクローン群は親魚同様にすべてが赤無地であった(図2)。これらはマイクロサテライトDNA多型検出法を用い、そのクローン性が確認されている(未発表)。

雄性発生は染色体倍数化を卵割阻止により行うことから、色彩の発現は卵割型雌性発生と同様である。卵割型雌性発生と大きく異なる点は、1代目では雄と雌とが得られることであり、この雄は超雄といわれている。1代目作出は卵割阻止を行うので、2代目はクローンとなる。雄は雌よりも早く成熟するため、クローンをより早く得るには、雄性発生の利用は有効である。実際に筆者らは雄性発生魚の雄から得られたクローンを数系統保有している(未発表)。

## 5. 染色体操作技術を用いた育種

このように紅白からクローンを作ろうとしても、できたクローンは赤無地または白無地であり、そのクローンにはニシキゴイとしての高い価値はない。そこで富田らが試みた赤無地×白無地の交配方法が考えられる。今のところ、クローンをを用いた交配試験は行われ

表1 ニシキゴイの雌性・雄性発生魚作出方法

作出方法		紫外線による 遺伝的不活化	処理開始 時間*	処理温度	処理時間	
雌性発生	極体型	精液	8000erg/mm <sup>2</sup>	受精6分後	40℃	2分間
	卵割型	精液	8000erg/mm <sup>2</sup>	受精40分後	40℃	2分間
雄性発生		卵	8000erg/mm <sup>2</sup>	受精40分後	40℃	2分間

\*: 受精水温20℃時

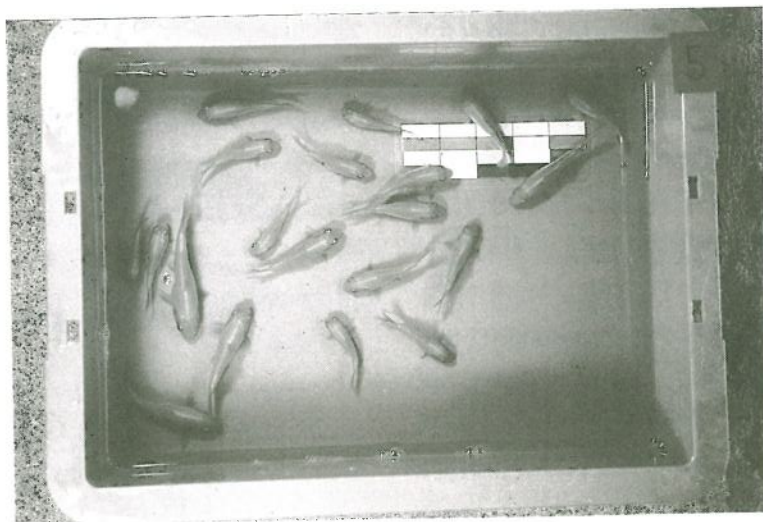


図2 赤無地クローン

ていないが、卵割型や雄性発生を用いた交配試験が試みられ、高い紅白出現率を示し、色彩も優良な組み合わせが得られている<sup>16)</sup>。今後はこれらのクローン系を作出し実証するとともに、多数のクローン系を用いた優良組み合わせの検索が必要となるだろう。

一方の極体型は、斑紋も持ちながら形質を優良化させることが期待できる。現状では、紅白出現率の向上について実績があるが、今後は成長や色質等、ニシキゴイにとって重要な形質に着目し、優良化を目指す必要がある。

## 6. さいごに

クローンが作出されるようになり、ニシキゴイの染色体操作技術も新しい段階へ入った。そしてニシキゴイ養殖も国内需要の低迷と海外需要の大幅な伸び、新興生産国の台頭と新しい時代へと入っている。現在のところ、日本のニシキゴイは生産・輸送コストが高いが、高品質という評価を得て、海外での売れ行きは好調である。しかしながら今後、新興生産国がさらなる品質向上を図ってきた場合、コストの面では太刀打ちできないのではないだろうか。さらに、一部では、染色体操作技術等先端技術の開発に努めている国もあり、今後の脅威ともなりかねない。こうした将来の競争をにらみ、産官学の連携が図られることを期待する。

なお、本研究の一部は水産庁補助事業によりなされたことを付け加える。

## 文献

- 1) 天野政之：錦ゴイ，「養魚学各論」（川本信之編），恒星社厚生閣，東京，1967，pp.48-74.
- 2) 岩橋正雄：錦鯉の親魚養成に関する研究－I II III IV，新潟県内水面水産試験場研究報告，1，32-46（1971）.
- 3) 岩橋正雄・富田政勝：錦鯉の品種改良に関する研究－VI，新潟県内水面水産試験場研究報告，4，71-74（1975）.
- 4) 松井佳一：「金魚と錦鯉－鑑賞と飼い方」，金園社，東京，1937，pp.248-265.
- 5) 越田秀包：「新潟県の色鯉（1）～（4）」，養賢堂，東京，1938，pp.13.
- 6) 和田克彦：魚介類のバイオテクノロジー，BRAINテクノニュース，57，13-17，（1996）.
- 7) 鈴木亮：染色体操作の原理と応用 2. 魚類，「水産増養殖と染色体操作」（鈴木亮編），恒星社厚生閣，東京，1989，pp.21-28.
- 8) Taniguchi, N., A. Kijima, T. Tamura, K. Takegami and I. Yamasaki: Color, growth and Maturation in ploidy-manipulated fancy carp, *Aquaculture*, 57, 321-328 (1996).
- 9) Hollebecq, M.G., D. Chorrou, G. Wohlfarth and R. Billard: Diploid gynogenesis induced by heat shocks after activation with UV-irradiated sperm in common carp, *Aquaculture*, 54, 69-76 (1986).
- 10) Komar, S., N. Taniguchi and K. Sugama: The necessary conditions and the use of ultraviolet irradiated sperm from different species to induce gynogenesis of Indonesian common carp, in "The second Asian fisheries forum" (ed. by R. Hirano and I. Hanyu), Asian Fisheries Society, Manila, 1990, pp.539-542.
- 11) 谷口順彦：ニシキゴイの新しい改良法について，日鱗，275，28-35(1990).
- 12) 佐藤将・近藤伸一・富田政勝：高温処理法によるニシキゴイ雌性発生の大量処理，新潟県内水面水産試験場研究報告，16，65-71(1990).
- 13) 佐藤将：ニシキゴイ雄性発生魚の作出について－II 卵核不活化のための紫外線処理量と照射時間の検討，新潟県内水面水産試験場研究報告，22，9-12(1997).
- 14) 網田健次郎：ニシキゴイにおける再雌性発生魚の発現状況，新潟県内水面水産試験場研究報告，20，29-34(1994).
- 15) 網田健次郎：ニシキゴイ白無地からの再雌性発生魚の発現状況，新潟県内水面水産試験場研究報告，21，29-32(1995).
- 16) 新潟県内水面水産試験場：平成10年度バイオテック利用養殖システム高度化事業報告書，（1999）.

## ◀文献情報▶

## 凍結乾燥法を利用した精子の保存

Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa

Teruhiko Wakayama and Ryuzo Yanagimachi  
*Nature Biotechnology*: 16:639-641 (1998)

精子の凍結保存方法の確立は生殖医学のみならず畜産分野においても革命をおこした。凍結した精子は融解すれば、精子の運動性はほぼ正常に回復し、遺伝情報も損なう事なく授精することができる。現在、精子の長期保存には $-196^{\circ}\text{C}$ の液体窒素で凍結する方法が頻繁に用いられている。しかし、この方法は手間がかかる上、コストもかさむ。そこで、これまで通常の温度環境でも精子が保存できる方法の確立をおめざし多くの試みがなされてきた。本論文では、マウス精子を凍結乾燥することで簡単に精子を保存でき、実際に正常なマウスが誕生したと報告している。

精子はマウスのお精巣上体尾部から採取したものをを使用した。培地に浮遊させた精子をガラスアンプルに分注して、液体窒素で凍結後、凍結乾燥システムで急速に乾燥させ、粉末状にした。これを室温(約 $25^{\circ}\text{C}$ )もしくは $4^{\circ}\text{C}$ で保存(1日~3ヶ月)した後、滅菌水を用いて再水和し、卵母細胞内に注入した。正常に受精した卵母細胞を4日間培養し、桑実胚もしくは胚盤胞まで発生した胚を仮親の子宮角に移植した。

その結果、凍結融解精子とは違い、凍結乾燥した精子では再水和後、その運動性はすべて失われていた。従来感覚では運動性がすべて失われた精子は死んでしまうと思われて

きた。しかし、精子を直接卵母細胞内に注入してやることで、室温では1ヶ月、 $4^{\circ}\text{C}$ では3ヶ月保存していたものでさえも正常に受精、発生し、分娩後も繁殖能を持つまで正常に成長することができた。また、この凍結乾燥精子を3週間ほどの旅行(その間の温度は $5^{\circ}\text{C}$ ~ $30^{\circ}\text{C}$ )に持ち歩き、それを用いて同様の実験を行ったが、それでもほぼ同様の結果となった。

これまでヒトとハムスターで凍結乾燥精子を卵母細胞に注入し、正常な前核形成を行う事は観察されているが、それが正常な成長をするかについての見解はなかった。しかし、この実験において凍結乾燥した精子からでも産仔を得ることができる事が明らかになった。著者らは今回用いた凍結乾燥プロトコールは今後さらなる改善が必要であるとしているが、この研究成果は雄のおお遺伝情報や受精後の発生能を失う事なしに精子を室温でも保存できる事を示唆するものである。

現在、この精子の保存技術はヒトや家畜の生殖・繁殖分野で用いられるだけでなく、医学研究に欠かせないトランスジェニックマウスの系統保存の面でも用いられている。系統の増加に伴い、それらを凍結保存によって維持するためにはかなりの維持費が必要である。この凍結乾燥法は精子を直接卵母細胞内に注入するためその技術的な訓練や設備が必要であるが、実現すれば雄の遺伝情報を室温もしくは冷蔵で簡単に保存・運搬する事が可能になり、維持費の面で大幅なコストダウンとなることから、これまでの液体窒素法に変わる新しい方法として期待されるものである。

(抄訳 横尾正樹・東北大)



## ◀文献情報▶

***Lactobacillus delbrueckii*  
*subsp.lactis* ペプチダーゼ遺  
伝子群の *Lactococcus lactis*  
への導入と発現調整**Introduction of Peptidase Genes from *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* into *Lactococcus lactis* and Controlled ExpressionU.WEGMANN, J.R.KLEIN, I.DRUMN,  
O.P.KUIPERS, and B.HENRICH*APPLIED and ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Nov.65(11): 4729-4733 1999

Lactococci (乳酸球菌) はチーズ製造のスターターとして広く使用されており、チーズの成熟過程の中で舌触り・味・香りの生成に重要な役割を果たしている。しかしながら、この過程は一般的に時間を要し複雑であるため、この過程を短縮させコントロールすることは工業的に重要となっている。そこで、本研究では、蛋白質分解系の解析が進んでいる *Lactococcus lactis* (以下 *Lc.lactis*) に、それが本来所有していない *Lactobacillus delbrueckii subsp.lactis* のペプチダーゼ群を導入することにより、この乳酸球菌が新たなペプチド分解特性を持つかどうかについて検討している。

導入されたペプチダーゼは PepI, PepL, PepW, PepG, PepQ の5つで、この内、PepQを除いては lactococci に同じ機能をもつ酵素の存在は認められていない。これらのペプチダーゼ遺伝子の発現調節は、*nisA* 遺伝子 (*P<sub>nisA</sub>*) のプロモーターとペプチダーゼの融合蛋白を作成し、Nisin(ペプチド性抗生物質) を添加することにより行われた。また、この

実験に最適なホスト株; UKLc10は、*Lc.lactis* が元来持つ5つのペプチダーゼを欠損させた株; IM16の染色体に、導入するプラスミドの選択性と安定性を確立させるため NisRK2 成分遺伝子を組み込み構築した。この組み換え株を利用して菌の生育、ペプチダーゼ活性、ペプチド利用、菌体内蛋白分解物についての解析を行った。

Nisinによる *P<sub>nisA</sub>*・ペプチダーゼ融合蛋白の誘導発現後、全ての発現蛋白は泳動ゲル中のバンドとして確認できた。ペプチダーゼ遺伝子の発現には同一の転写・翻訳シグナルが利用されているにも係らず、個々の蛋白の相対的な量にはかなりの差が認められた。この理由として転写後の作用(mRNAの安定性・翻訳効率・蛋白の安定性など)が考察されていた。組み替え UKLc10 株抽出物には全てペプチダーゼ活性が見られたが、*in vivo* で必須アミノ酸源としてペプチド基質を利用できるものは PepL, PepG のみであった。菌体内では基質の切断が余り効率的では無いことが推察される。さらに、乳培地において検討を試みたところ、*pepG* と *pepW* をそれぞれ誘導させることにより、生育速度の上昇が認められた。これらの酵素がエンドペプチダーゼ活性を示すことが生育速度の上昇に関係していると思われる。

以上の結果から、Lactococci (乳酸球菌) に *Lactobacillus* (乳酸桿菌) のペプチダーゼを導入することにより、必須アミノ酸原としてのペプチド利用性の増加、及び生育速度の上昇が認められた。チーズ製造工程の簡略化と新規な風味の開発の観点から、非常に興味深い研究であると考えられる。

(抄訳 上野敬太 カルピス(株))

## ◀文献情報▶

### 単子葉植物と双子葉植物における葉の発生様式の比較

- (1) ROUGH SHEATH2: A Myb Protein That Repress *knox* Homeobox Genes in Maize Lateral Organ Primordia

Marja C. P. Timmermans, Andrew Hudson, Philip W. Becraft, Timothy Nelson  
*Science*, vol. 284:151-153 April. 1999

- (2) The Maize *rough sheath2* Gene and Leaf Development Programs in Monocot and Dicot Plants

Miltos Tsiantis, Richard Schneeberger, John F. Golz, Michael Freeling, Jane A. Langdale  
*Science*, vol. 284:154-156 April. 1999

植物体の地上部を構成する、葉、茎、花などの器官は、茎頂分裂組織 (shoot apical meristem: SAM) から発生する。そのため、SAMにおける遺伝的な制御機構の解析は、植物の形態形成を理解する上で非常に重要である。現在、SAMの維持やシュートの発生に中心的な役割を担っているのは、ホメオボックス遺伝子であるといわれ、双子葉、単子葉を問わず多くの被子植物で見つかっている。特に、トウモロコシの *KNOTTED1* 遺伝子と相同性が高い *kn1-like homeobox genes (knox)* ファミリーは、細胞が未分化な状態であるSAMで発現し、器官への分化が決定した細胞では発現が抑制されることが知られている。

トウモロコシの劣性突然変異体 *rough sheath2 (rs2)* にみられる表現型は、葉舌の先端方向へのずれなど、*knox* 遺伝子が過剰発現したときのものに類似していたため、*rs2* における *knox* 遺伝子の発現パターンを解析したところ、SAMのみでなく、葉原基においても発現していた。このことから、*rs2* の表現型は *knox* 遺伝子の異所的な発現によるものであること、また、本来 *RS2* 遺伝子は *knox* 遺伝子に対して負の制御機能を持つことが示唆された。

さらに、*RS2* 遺伝子はクローニングされた結果、Myb 様の転写調節因子をコードし、シロイヌナズナの *PHANTASTICA (PHAN)* 遺伝子と相同性が高いことがわかった。*phan* 突然変異体は、葉が細いひも状になってしまう突然変異体である。また、野生型トウモロコシにおける *RS2* 遺伝子の発現は、葉原基や花の器官原基などで見られ、SAM で発現する *KNOX* 遺伝子とは互いに抑制的であることが明らかになった。この *KNOX* 遺伝子と *RS2* 遺伝子の関係は、*KNOX* 遺伝子と *PHAN* 遺伝子の間でも保存されていた。すなわち、単子葉植物のトウモロコシと双子葉植物のシロイヌナズナの葉の発生様式には、遺伝子とその interaction が保存されていたのである。

2報の間では、*phan* のひも状になる葉の解釈において若干の相違があるものの、単子葉と双子葉植物の葉の発生様式を比較考察する上で貴重な報告であるといえる。

(抄訳 木苗貴秀・東京大)

## ◀文献情報▶

## リパーゼを触媒とした構造トリグリセリド合成における最適反応条件の検討

Optimization of the Reaction Conditions in the Lipase-Catalyzed Synthesis of Structured Triglycerides

U. Schmid, U.T. Bornscheuer, M.M. Soumanou, G.P. McNeill, and R.D. Schmid  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*: 75,1527-1531, 1998

近年、脂肪酸の有する栄養生理活性はそのグリセロールとの結合位置の影響を受けることが明らかになり、油脂の脂肪酸組成のみならず、脂肪酸の結合位置との関連で脂質栄養が論じられるようになった。特定の脂肪酸をグリセロールの特定の位置に結合させたトリグリセリド(TG)を構造脂質あるいは構造TGと呼び、最近この分野の研究は進展著しいものがある。TGの1,3位に中鎖脂肪酸(ex.C8)を2位に長鎖不飽和脂肪酸(ex.C16-C22)を結合した構造TGは消化・吸収が十分でない患者にとって効果的なエネルギー源となり、また、母乳中のパルミチン酸(PA)は育児用調製粉乳中の分布とは異なり、主にTGの2位に存在し、1,3位にオレイン酸(OA)が結合した1,3-オレイル-2-パルミトイル-グリセロール(OPO)分子として多く含まれる。乳幼児にとってOPOは重要な構造TGであり、消化後生成する2-パルミトイル-グリセロール(2-PA-MG)は吸収性に優れ、効率的なエネルギー源として利用される。

著者らはOPOを収率よく高純度に合成するため、2段階の酵素反応を組み合わせた製造法を検討した。

その結果、1段目の反応ではセライトに固定化したRhizopus delemar(1,3位特異性リパーゼ)のリパーゼを用い、メチル-セブチルエーテル(Aw=0.11)中でトリパルミチンのエタノリシスを行なうことにより(40℃, 800rpm, 24時間)、2-PA-MGを収率よく産生でき(反応混液中にはパルミチン酸エチルと少量のPAを含む)、濾過後反応混液を結晶分別することにより(-25℃, 一晚放置)、2-

PA-MGを95%の回収率で析出・単離できた。2段目の反応ではn-ヘキサン(Aw=0.11)中で2-PA-MGとOAのエステル化を行った。附随して起こる2-PA-MGのアシル基転移反応を防ぐため、モレキュラーシーブスを加え、生成する水を除去(脱水)しながらRhizomucor mieheiの固定化リパーゼ(1,3位特異性リパーゼ, 商品名; リボザイム)あるいはセライトに固定化したRhizopus delemarのリパーゼを用いて2時間(38℃, 800rpm)反応した。その結果、目的とするOPO油脂を純度72%で合成することができた。

また、この反応を応用し、循環器系あるいは中枢神経系の正常な機能発現・維持に必須なエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)などの高度不飽和脂肪酸(HUFA)をTGの2位に含有する構造脂質の製造法も検討した。EPA10.5%, DHA7.8%含有する魚油およびEPAのみ37.4%含有する魚油を原料とし、アセトン中(Aw=0.94)でエタノリシスを行った(40℃, 800rpm, 24時間)。アセトンを用いるとアシル基転移を効果的に抑制することができ、Rhizopus delemarのリパーゼをポリプロピレンに固定化して用いることにより、2-MGの収率を最も高めることができ、それぞれ37%, 84%の回収率となった。(前者は原料魚油の1,3位にも分布するDHAに対し、リパーゼが作用しないため、2-MG収率に影響を与えている。)得られた2-MGはDHAあるいはEPAを主成分とし、極めて低い融点を示すことから、2-PA-MGの精製で用いた結晶分別法では単離できない。そこでスケールアップ可能なオープンカラムを採用し、シリカゲルクロマトグラフィーによる分離法を検討した。このクロマトではホウ酸処理を施したシリカゲルを用いることにより、1,(3)-MGへのアシル基転移を抑制でき、2-MGを高収率で分離することが可能となった。さらに中鎖脂肪酸を選択し、OPOの製造で用いたエステル化条件を採用することで、HUFA含有構造TGを高収率で製造できるものと予想された。

(抄訳 丸山一輝—マルハ中研)

## ◀文献情報▶

イネいもち病菌の病原性機構  
に働く ATP-binding cassette (ABC) transporter

An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease

Martin Urban, Tishina Bhargava, and John E. Hamer

*The EMBO Journal* 18: 512-521, 1999

植物細胞内には、病原菌への抵抗性に寄与する種々の潜在的な、あるいは感染誘導的に生合成される抗菌物質が存在する。植物病原菌は、植物感染時にこれらの抗菌物質に遭遇し、その中で耐性を獲得したものだけが、病原性を発揮することができる。植物病原菌の中には、解毒酵素によって病原性を獲得するものもあるが、その遺伝子破壊による変異株では、病原性への影響は認められなかった。そのために、植物細胞内での生存、病原性発現にはさらに他のメカニズムが存在していると考えられていた。

本論文の著者らは、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) から ABC transporter 遺伝子 (ABC 1) を単離し、ABC transporter が新たな病原性発現戦略としての可能性を持つことを報告している。ABC transporter は、細菌からヒトまで 100 種類以上にわたって同定されている ABC transporter superfamily である。ABC transporter は ATP に依存して、細胞内毒素を細胞外に排出するポンプの作用をし、ヒトのがん細胞での多剤耐性現象に関わる遺伝子がコードするタンパク質としてその存在が明らかになった。

著者らは、遺伝子挿入により病原性を欠いた変異株 TF 7-3131 を作出し、そこから ABC 1 遺伝子を単離し塩基配列を決めた。遺伝子は ABC1 遺伝子の推定プロモーター領域に挿入されていた。ABC 1 がコードするタンパク質 Abc 1 は、*C.albicans* の Cdr 1 タンパク質

および *S.cerevisiae* の Pdr 5 タンパク質と 47% の相同性を示し、その配列中に ABC transporter superfamily を特徴付ける親水性ドメインと疎水性ドメインが認められた。

次に、得られた遺伝子挿入変異株 TF 7-3131 と ABC 1 遺伝子の ORF1.9kb を HPH 遺伝子と置き換えた変異株 AM25 の病原性について調べた。野生株に比べ変異株 TF 7-3131 と AM25 をイネ葉鞘に接種した場合、ほとんど褐色斑は認められず、他の品種や大麦においても同様の結果が得られた。イネいもち病菌が宿主に感染し、病徴を示すまでの過程において、菌の生長速度、分生子形成、付着器形成に、野生株と変異株間の差異はみられなかったが、変異株は正常な感染菌糸を形成することができなかった。このことから、変異株では、宿主侵入直後の段階で病原性が失われていると考えられた。

ABC 1 変異株は、他の ABC transporter 遺伝子変異株の特徴である薬剤感受性は示さなかった。しかし、抗菌物質、イネのファイトアレキシン、タンパク合成阻害剤などの薬剤処理により ABC 1 遺伝子の転写レベルが著しく促進されること、また ABC 1 のプロモーター領域の遺伝子挿入による変異株 TF 7-3131 では転写レベルが低く、遺伝子欠陥変異株 AM25 と同様に病原性を欠いていたことから、ABC 1 mRNA の上流域の調節がイネいもち病菌の病原性に重要であることが示された。

以上の研究より、イネいもち病菌において ABC transporter は、宿主細胞内に存在する抗菌物質を細胞外に排出することで、感染初期過程において防御機能の役割を果たしている可能性が示唆された。他の病原性糸状菌においてもこの可能性は考えられ、さらなる解明が、今後の植物保護における糸状菌病防除の発展につながると思われる。

(抄訳 及川志保・東北大)

◀海外便り▶

## DNAの引き算による病原性関連遺伝子単離の試み —カリフォルニア大学デービス校における1年間—

農林水産省 農業研究センター  
竹原 利明

### 1. はじめに

1997年1月から1年間、科学技術庁長期在外研究員として、米国カリフォルニア大学デービス校の植物病理学科で研究する機会を得た。私の目標は、作物に病気を引き起こす土壌生息菌であるフザリウム菌というカビの、病原性に関わる遺伝子を見出すことであった。しかし、アメリカの研究力の源泉はどこにあるのかを考える1年でもあった。1年間アメリカの研究環境に触れて感じたことが多くあるので、研究の内容とともに、その一片を紹介したいと思う。

### 2. カリフォルニア大学デービス校の概要

デービスはサンフランシスコから北東へ車で約1時間のところにある、人口約5万人ののんびりとした大学町で、住民の大半が学生または大学関係者である。治安もよく、住居費も安いので、とても生活しやすいところである。デービス校は広大な圃場を所有し、農業・植物関係の多数の学科において、分子生物学から広い敷地を活かした圃場レベルの研究まで幅広く行なわれている。ここの植物病理学科には26の研究室があり、植物病理学に関しては約100名の一大研究勢力となっている。

### 3. アメリカの研究力の源泉は？

カリフォルニア大学デービス校の研究環境  
TAKEHARA Toshiaki  
〒305-8666 つくば市観音台3-1-1

などを日本（主に農水省の研究機関）と比較して、違うところ、研究進展に役立っているところなどを書いてみたい。

まず、設備・機械であるが、日本の研究機関と比べて取り立てて立派というわけではない。むしろ、新しいものは少なく、頑丈なものを長く使っているという印象である。ただし、古い建物でも、各部屋にイオン交換水の出る蛇口があり、ベンチ上に空気の噴出・吸引口をもつ配管（アスピレーター等として使える）が張りめぐらされていることには驚いた。また、室内は24時間常時25℃程度に保たれている。日本と大きく違うのは、研究室間の（心理的な）壁が低く、お互いに気軽に出入りして必要な機械を効率的に使っていることだ。当然コミュニケーションも盛んで、新たな情報の源となっているように思う。オートクレーブや電気泳動のゲル撮影装置などは多くの研究室で共有しており、使用頻度が高いので常時つけっぱなしになっているため、立ち上げの時間がかからない。

研究支援部門では、物品購入事務の責任者は一人で、無駄な書類がない。また、中間業者がおらず、メーカーから直接物品が送られてくるため、伝票を切ってからの待ち時間が1週間以内に納品される。エッペンチューブ、キムワイプ、制限酵素など日常使う実験用品の大部分は、大学内の売店で研究費で買うことができる。この売店のレジはコンピュータネットワークにつながっており、名前と研究予算の暗号をいうと代金とその予算項目から引き落とされる仕組みのようである。使ったガラス器具などはバットにまとめて汚れ物と表示しておけば、洗浄室に行き滅菌されて

帰ってくるようになっていいる。また、温室管理者がいて、あらかじめ指定しておけば水やりもそのようにしてくれる。膨大な蔵書数を誇る図書館内にはコンピュータ端末が至るところにあり、文献検索をするとその雑誌の配架場所が記号で示されて容易に見つけられる。

教育の面では、菌類学や植物病理学の授業は実験重視で、学期内に2回行なわれる試験は筆記と実技に分かれている。実技試験は、試験室内に実物や顕微鏡標本がずらりと並び、これは何かと答えさせる問題である。当然学生は授業に積極的に出て意欲的に学び、教授陣も試験材料を毎回準備する甲斐性を求められる。

個々の研究者は、取り立てて時間をかけて研究しているようには見えず、夜や週末を家族と共に有意義に過ごしているようであった。ただし、アメリカ人の朝は早く、多くの人には8時に仕事を始めている。決まった休憩時間はなく、昼食はパソコンに向かいながらサンドイッチをほおばるとい程度の人が多いようだ。また、研究内容として、私のいた研究室では、病原菌の分子生物学的な解析と平行

して、圃場での泥臭い生態的研究も進めていた。

いろいろと書いたが、アメリカの研究が世界をリードしている理由は一概には言えないと思った。上に述べたような合理的な研究環境とあわせて、個々の研究者が流行に流されずに、人と違うことをすることに意義を見いだしていること、また、海外の優秀な研究者に門戸を開き、積極的に受け入れていることなども大きな要因であろうかと思う。

#### 4. DNAの引き算による病原性関連遺伝子単離の試み

私はThomas R. Gordon準教授の下で、メロン品種に対する病原性が異なる2つのフザリウム菌株を供試し、近年開発された“Genomic Subtraction”（ゲノムの引き算）と呼ばれる手法で、2菌株間で異なるDNA断片の検出を試みた。Genomic Subtractionは、2つの個体の間で遺伝子（DNA）のどこが違うか見つけだすための手法で、概念としては、図1のように全DNAを制限酵素というハサミのような

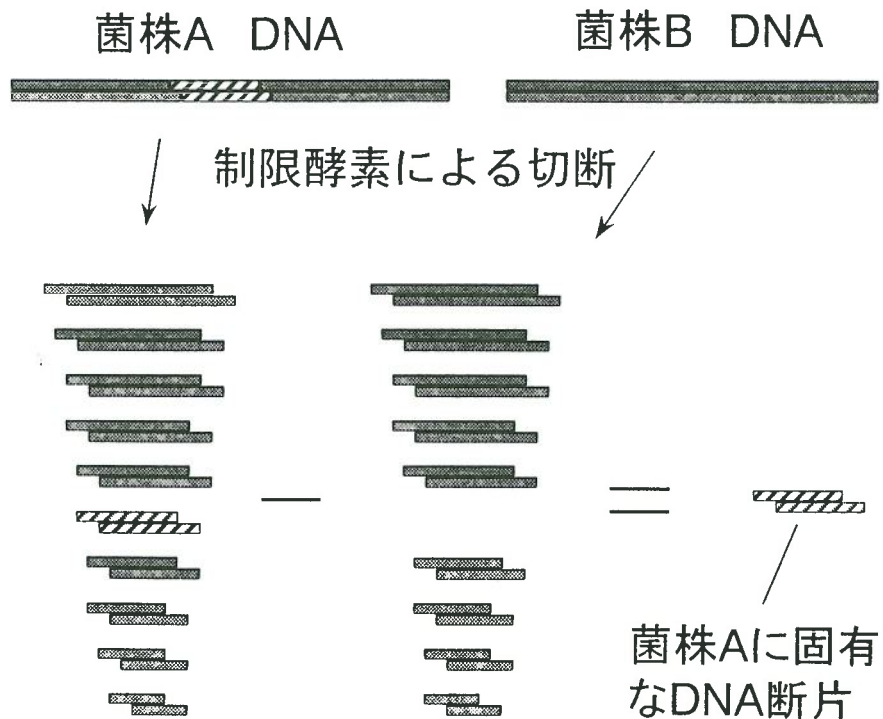


図1 Genomic Subtraction の概念

もので切断した後、一方から他方を引くこと  
によって前者に固有な DNA 配列を残すとい  
うものである。引くといっても、実際には両

者の DNA 断片をわずかな水滴の中で混ぜ合  
わせ、熱変性によって DNA を一本鎖にし、2  
つの DNA の共通部分は相補性によって会合

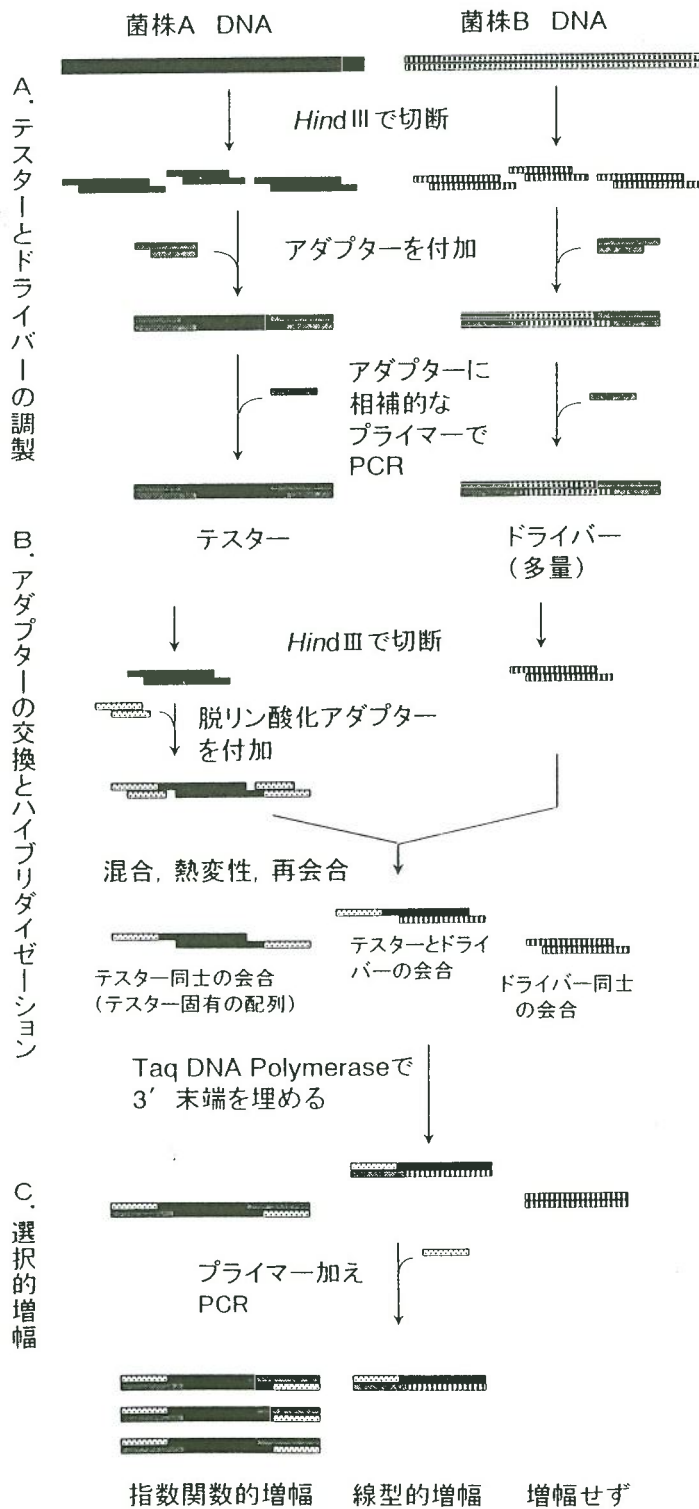


図2 Representational Difference Analysis (RDA) の手順

させ、違うところだけ物理的に取り出す、あるいは選択的に増幅させるという感じである。

実際に試みたのは、Genomic Subtractionの中でも“Representational Difference Analysis”(RDA)と呼ばれる巧妙な手法である(図2参照)。まず、供試2菌株(菌株Aをテスター、菌株Bをドライバーと呼ぶ)のDNAを抽出し、*Hind* IIIという制限酵素によって多くの断片に切断した後、アダプターと呼ばれるオリゴヌクレオチドを各断片の両端に付加した。各断片を増やすために、アダプターに相補的なプライマーを用いてPCRを行なった。増幅された断片を再び*Hind* IIIにより切断してアダプターを取り除き、テスター菌株の断片には新たなアダプター(5'末端が脱リン酸化されているもの)を付加した。その後、両菌株の間でSubtractive hybridization(引き算ハイブリダイゼーション)を行なった。すなわち、両DNAの共通配列を会合させるため、少量のテスター断片と大量のドライバー断片を4  $\mu$ lの反応液中で混合し、高温で一本鎖に分離させた後、65°C、20時間のハイブリダイゼーションを行なった。会合した各断片の3'末端を*Taq* DNAポリメラーゼにより補充した後、第2のアダプターに相補的なプライマーを用いてPCRを行なった。ここでは上で用いた脱リン酸化アダプターの仕掛けにより、テスター同士が会合した断片(テスターに固有の断片)のみが効率的に増幅されるしくみになっている。選択的PCRにより増幅したDNA

断片を*Hind* IIIで消化してアダプターを取り除き、また新たなアダプターを付加した。ドライバーDNAと混合し、ハイブリダイゼーションと選択的PCRをさらに2回繰り返した。その結果、電気泳動により、テスターのみに固有と見られるDNA断片のバンドが確認された。本DNAを日本に持ち帰ったので、今後は、サザンハイブリダイゼーションによりこのDNA断片の特異性を再確認した後クローニングを行ない、塩基配列の決定や病原性特異的プローブの開発を試みる予定である。

## 5. おわりに

日本と異なる文化圏で生活すること、また、日本を外から眺めることは、極めて貴重な体験であった。英語は渡米前にもかなり一生懸命勉強していたが、やはり現地の早口にはなかなか慣れなかった。現地には優れた英語教材もあり、また、英語に囲まれて生活することは、わが国では得られない貴重な英語訓練となったが、1年間では、十分なコミュニケーションをとれるだけの英語力は身につかないといえるだろう。今後は、2年間くらいの滞在で若い人たちが英語力をつけられるような制度が整備されることを期待したい。

最後に、留学に際しご迷惑をおかけした研究室の方々とその他お世話になった方々、また、慣れない外国生活の苦労をとともにしてくれた妻に感謝したい。



◀特別情報▶

ブレインテクノフォーラム  
1999年10月5日開催報告

## 質的形質に関するゲノム解析の最前線 —イネ・ヒトから家畜まで—

このフォーラムは、昨年10月5日東京国際フォーラムを会場として開催されたもので、その開催次第は、右記のとおりである。

フォーラムは、堤英隆生研機構理事長の開会の挨拶により開始されたが、このなかで、本フォーラムは平成7年（1995）開催の「家畜からのおくりもの」に始まる生研機構の畜産シリーズの一環であり、今回のテーマの企画は社団法人畜産技術協会の全面的な協力のもとに進められたこと、また開催にあたって農林水産省、社団法人農林水産先端技術産業振興センター、日本中央競馬会等の多大の協力を得たことが紹介された。

続いて、本フォーラムの総合司会を担当した関川農水省家畜衛生試験場生体防御研究部長より、フォーラムのテーマについて、マウスの肥満、乳牛の産乳量、鶏の産卵数のような遺伝形質は連続的な変異を示し遺伝支配が複雑な量的形質であるのに対して、エンドウ豆の花の色、牛の角の有無、ヒトや家畜のある種の遺伝病等の遺伝形質は非連続的な変異を示し単純なメンデル型の遺伝に従う質的形質であり、現在のゲノム解析の分野でこれらは二つの大きな潮流となっているので、このフォーラムはその意味で非常にタイムリーであると解説され、各演者の講演に移った。

慶応義塾大学の清水信義先生は、ヒトゲノム研究の日本における推進者の一人であるが「ゲノム医学」という新しい分野の確立を提唱し実践している研究者でもある。同先生は、慶応義塾大学で行っているゲノム研究の概要、同先生の研究グループが発見した遺伝性疾患の遺伝子、さらにゲノム研究における技術的な問題の紹介を行った。ヒトでは1-22番XYの24種類の染色体のDNAは30億塩基対（30億文字）から成り、約10万種の遺伝子がある

### ブレインテクノフォーラム 質的形質に関するゲノム解析の最前線 イネ・ヒトから家畜まで

主催：生物系特定産業技術研究推進機構・（社）畜産技術協会

後援：農林水産省

協賛：（社）農林水産先端技術産業振興センター（STAFF）

日時：平成11年10月5日（火）13:00～17:00

場所：東京国際フォーラム、D-501会議室（東京都千代田区丸の内3-5-1）

フォーラム次第：

1. 開会（13:00）
2. 開会挨拶：堤 英隆（生物系特定産業技術研究推進機構理事長）
3. 総合司会者挨拶：関川 賢二（農水省家畜衛生試験場生体防御研究部長）
4. 講演演題ならびに演者：
  - 1) ヒト疾患遺伝子の構造と機能：新たなゲノム医学の展開  
清水 信義（慶応義塾大学医学部教授）
  - 2) イネゲノム解析による有用遺伝子のポジショナルクローニング  
矢野 昌裕（農水省農業生物資源研究所ゲノム複製研究室長）
  - 3) 和牛遺伝性疾患のゲノム解析と遺伝子診断法の確立  
平野 貴（（社）畜産技術協会動物遺伝研究所研究員）
  - 4) 角に関するヒトゲノムの探索：ウシの有角・無角遺伝子領域における比較微細地図作製と配列解析を通して  
デイビス K. スコット（テキサス農工大学教授）
5. 閉会挨拶：松川 正（（社）畜産技術協会動物遺伝研究所長）
6. 閉会：（17:00）

と考えられている。ヒトゲノム解析は国際協力プロジェクトとして1991年に始まり、2003年には全遺伝子の解読が終わる計画であるが（現在の達成度約20%）、英米では来年春にはラフな解読を終わらせる計画が立てられている。清水研究室では、ヒトのいくつかの染色体の特定の生物学的・遺伝学的に興味のある領域に的を絞って新しい遺伝子を見つけるといったアプローチをとっている。そのため、ゲノム断片をBACライブラリーに蓄積し、プローブを用いてDNA断片をシーケンスして遺伝子探しを行っているが、これにはコンピュータを用いる。遺伝子が疾患に関連して

いと予想されるときは、患者のDNAとマッチングを行う。こうして清水研究室で発見した遺伝子は、自己免疫疾患APECEDの原因遺伝子 Aire (1997)、緑内障の原因遺伝子 Myocilin (1997)、若年性(遺伝性)パーキンソン病の原因遺伝子 Parkin (1998) 等があり、その経過を詳しく報告された。

農業生物資源研究所の矢野昌裕先生は、2-3万の遺伝子があると考えられている12種染色体のイネゲノム研究について、1991年に開始されやはり国際的な共同プロジェクトで推進されているが、ヒトなどに比べ遺伝的操作が容易である反面、分子生物学的基盤づくりが必要であった経過を紹介した。91-97年の基盤づくりは、(1) 発現遺伝子(cDNA)ライブラリー、EST化された塩基配列情報の蓄積、(2) 染色体上の遺伝子連鎖地図の作成、(3) 酵母人工染色体(YAC)クローンの整列化地図の作成の3つの過程であった。イネゲノム研究は、現在第2段階に入っており、遺伝子の機能確定にはポジショナル・クローニング法が用いられているが、これには植物ならではの形質転換による相補検定が使用され、同先生の研究室で発見したイネいもち病抵抗性遺伝子 Pib、矮性遺伝子 d1 の2つの質的形質遺伝子の同定経過が紹介された。また作物として重要な量的形質であるストレス耐性、収量性や食味性に関与する複数遺伝子(QTL)解析を通じて体系化されたポジショナル・クローニング法が紹介された。

動物遺伝研究所の平野貴先生は、人工的な改良が重ねられた世界の家畜種のウシには数多くの遺伝病の存在が報告されているが、日本で品種育成された黒毛和種肉牛に見られた遺伝性疾患慢性間質性腎炎の遺伝解析の結果を報告した。患牛は、特定種雄牛の産子にみられ、臨床上下痢、食欲不振、背湾姿勢、過長蹄、タンパク尿を示し、病理学的に糸球体変性、尿細管再生不全、リンパ球浸潤、間質増生が認められ、家系調査から常染色体単純劣勢遺伝病とみなされた。霜降り肉形質を得るため特定種雄牛の精液を集中して人工授精に使用するため、種牛の不良因子が牛群に拡

散してこのような遺伝病を招来するが、それを防ぐためのキャリアー牛の淘汰は優良因子の排除を齎すため、原因遺伝子の同定とDNA診断法の確立が要請された。平野先生らのグループは、連鎖解析の結果、ウシ染色体1番(BTA1)のBM9019に原因遺伝子座が存在すること、null-alleleの連鎖領域に原因となる欠損があることを予想し、腎臓のcDNAライブラリーのスクリーニングにより原因遺伝子 Claudin-16 を突き止め、欠損領域のシーケンスを基にPCR法を用いた診断法を開発しているが、その経過を詳しく報告された。

テキサス農工大学のスコット・デイビス先生は、ウシの角を出現させる遺伝子をどう突き止めればよいかという進行中のプロジェクトを担当しているが、これはテキサスのアングルトンにおける614頭の子牛の経済形質の調査に始まったことからアングルトンプロジェクトとも呼ばれている。牛の角は仲間や人を傷つけ肥育育成の障害になるため、人為的な除角が行われるが、動物福祉の関係で無角は今や重要な経済形質になっている。角無しの遺伝子は Poll と言われるが、2つの対立遺伝子で PP は無角、pp は有角、Pp は無角又は瘤程度となるが、デイビス先生の角の遺伝子の探索は、角のあるウシ(ブラーマン種)と角の無いウシ(アンガス種)の家系構造のマッピングから始まっている。この間、絶滅の危機から守るため家畜ウシ(有角のヘレホード種)との交配が行われた野牛(アメリカバイソン)の Poll 遺伝子の調査も行い、角の遺伝子は角の有無にだけ関係し、角の形状には無関係であることを明らかにしている。Poll 遺伝子は染色体1のセントロメア領域にあることがわかり、ヒトとの対応はヒト染色体21のマップと結び付けられるとの仮説のもとに行った検索結果が紹介され、現時点で無角遺伝子はまだ特定されていないと報告された。

最後に、松川正畜産技術協会動物遺伝研究所長より、演者ならびに総司会者、参集者各位に深甚の謝意が述べられ、フォーラムは無事終了した。(編集部 島山記)

#### 編集後記

ブレイン・テクノニュース第77号をお届けいたします。2000年最初の発行号になります。

本号から巻頭言のページを設けました。最初の巻頭言でありますので、本号では当生物系特定産業技術研究推進機構の堤理事長より年頭のご挨拶と抱負を述べていただきました。

今後は、当生研機構ならびに関連深い各界の方々からの有益なご提言やご助言をいただければと願っております。

本号の総説では、最近実用化が進みつつある“生物農薬”をとりあげ、当生研機構の鈴井孝仁研究リーダーに執筆をお願いしました。また、表紙写真には静岡県農業試験場の西東力氏、北海道農業試験場の奈良部 孝氏の原図を掲載させていただきました。両氏に厚く御礼申し上げます。

国内情報では、農水省国際農林水産業研究

センターの篠崎和子氏、生研機構畜産工学研究部の山名伸樹氏、生研機構の田中宏樹氏、地域研究では新潟県内水面水産試験場の佐藤将氏、海外便りでは農水省農業研究センターの竹原利明氏、文献情報では横尾正樹氏（東北大）、上野敬太氏（カルピス）、木苗貴秀氏（東京大）、丸山一輝氏（マルハ）、及川志保氏（東北大）の各氏から、貴重な原稿を寄せていただきました。改めて御礼申し上げます。

お詫び。前号第76号の目次における表紙写真説明1行目の「a抵抗性の最も“強”い組換え系統…」のところで“強”の字が脱字しておりました。ここに訂正するとともに、関係各位に深くお詫び申し上げます。

次号78号では、総説として生理活性物質サイトカインをとりあげる予定です。ご期待下さい。  
(島山記)

#### 本誌著作物の複写等について

本誌掲載の論文・記事の複写・転載を希望される方は、執筆者ならびに生研機構の許諾を得て行ってください。

ブレインテクノニュース (第77号)

平成12年1月15日発行

編集兼発行者 堤 英 隆

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

e-mail kikaku@tokyo.brain.go.jp

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 2000