

.....
解 説

作物保護とバイオテクノロジー (その 4)

—微生物起源農薬と遺伝子操作—

矢野 圭 司

東京大学農学部

(昭和 59 年 8 月 20 日受理)

Applications of Biotechnology to Plant Protection (4)

Pesticides of Microbial Origin and Gene Engineering

Keiji YANO

Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

はじめに

農薬とは農業に関係のある薬剤と一般に解釈されるが、病原菌や病害虫を駆除、予防する目的の薬剤以外にも農作物の生理機能の増進、または抑制に用いられる成長促進剤、発芽抑制剤その他の薬剤が含まれるとすると、きわめて多岐にわたり、英語で pesticide と称する範囲からはみ出してしまふ。それはともかく、筆者はそのような農薬、あるいは生理活性物質とは無縁であったので、ここでは“遺伝子操作”の立場から見た解説とならざるをえない。また最近の本誌の解説もあり¹⁾、概念的なことは重複を避け、“耳”情報から思いついた事柄を中心としたい。そして微生物農薬を微生物起源農薬と拡大させていただく。

微生物の持つ機能を農薬として利用する例はすでにいろいろ知られているが、今後の問題として考えてゆく場合、作用や機能の面でなく、扱う形態、物質構造の点で考えると大約三つに分かれると考えられる。第 1 には微生物そのものを用いる場合、第 2 にタンパク質などの高分子物質の場合、第 3 に比較的低分子の化学物質の場合である。この中で現在まで、あるいは将来ともに重要視されているのは第 3 の場合であろう。すでに記したように農薬を全体としてみれば、最終目的を農作物を中心とする植物の防疫、保護、栽培促進に限ったとしても、標的となる生物は、ウィロイド、ウイルスのような寄生体、

原核、真核微生物、動物(昆虫)、植物(雑草)など生物界のすべてに帰属するわけであるから、とうていここで作用や機能ごとに分けて論ずるのは避けたいのであるが、利用媒体を微生物と限定すれば、前述のような分け方も意味があるであろう。

第 1 の場合で著名なのは *Bacillus thuringensis* が古くから知られており、その殺虫性を農薬に欧米では用いられている。第 2 の場合は、*B. thuringensis* の作用が、感染というよりは、この菌の産生する毒素が主役であることから考えられ、また原核微生物の抗生物質的タンパク質であるバクテリオシンや、真核微生物でのキラータンパク質の例からも考えられる手段であるが、未開発に近いと考えてよいだろう。第 3 の場合はジベレリンや、プラストサイジンに代表される生理活性物質や抗生物質の類であって、おそらく編集者の依頼もここにあるのではないかと推察している。しかしながら率直に言ってこの分野での遺伝子操作の研究はまだ十分とはいえないし、結局のところ抗生物質など、いわゆる 2 次代謝生産物の生産における遺伝子工学の内容と完全に重複してしまうことになる。

したがって、ここでは大局的にみて、微生物機能を引き出すのに遺伝子レベルでどのようなことが考えられるかを述べてみる。微生物機能を引き出すには、培養条件など環境を変える外因的なこともあるが、内因的な遺伝子レベルで決まるので、遺伝子を付与する面で検討した

い。ただし、目的の植物への遺伝的付与、たとえば耐性遺伝子を外部から付与するなどのことは除外する。

遺伝的特性を付与する従来の育種手段

動物や植物の育種では、古い時代から交配による育種が広く用いられてきた。属間は困難でも、種間交配によって、今までその系統には認められなかった形質を付与する試みは多くの例を残した。すべての種間交配が稔性をもつ次世代を生むとは限らないが、そのような意味では、元来が1倍体 (haploid) である原核生物や、有性生殖が明瞭に認められないいわゆる不完全菌 (fungi imperfecti) と総称する菌類では交配に相当する操作が使えなかった。細菌などの糸状菌の菌糸間で吻合 (anastomosis) が起こり、双方の核が遺伝的に異なる場合にヘテロカリオン (heterocaryon) が結果としてでき、それを紫外線照射によって融合させる先駆的研究があり²⁾、育種手段として試みられているが大系化されるに至っていない。しかし、最近における細胞融合はこの延長線上にある。細胞をプロトプラスト化、スフェロプラスト化して、ポリエチレングリコール存在下で融合させて新形質を保持させようと試みられている³⁾。また融合させるのに、電気融合法が開発されている。ただし、形質を指定して付与させるところまでは至ってなく、あくまでも試行錯誤によるものであり、新形質が安定に保持されるための選択圧が特定できるものではない。

融合によって遺伝情報がそのまま倍加する例は少なく、DNA 塩基配列相同性に起因する相同性組換えが染色体間でおこり、しだいに不要の DNA 区分が捨てられてゆくの一般的なものである。DNA 塩基配列の相同性組換えはかなり古くから知られており、意識的にも育種手段として用いられてきた。原核生物での形質転換や形質導入、あるいは接合による遺伝子伝達も、結果的には、後述のプラスミドとして保持される場合を除いては、相同性組換えを起こすことを利用している。DNA 塩基配列の相同性がかなり長い区分として要求されるので、同種、近縁の間に限られ、しかも当初、形質転換の有効性は *Diplococcus pneumoniae* などの病原菌や、*Bacillus subtilis* の特定菌株間でしか認められていなかった。応用例は少なかった。それでも形質転換能を利用して *B. subtilis* で α -アミラーゼ産生を増強した例がある。これはいろいろな変異手段によって得られたアミラーゼ産生能が上昇した菌株の DNA 標品を用い、その形質を次々と形質転換で付与する方法で、最終的に 7000~10000 倍にまで増強されている⁴⁾。この中でもツニカマ

イシンに耐性獲得でアミラーゼ産生能が強化した段階があるが、この強化が遺伝子重複によることが最近示されている。アミラーゼ構造遺伝子の近傍にツニカマイシン耐性遺伝子 B が存在し、ツニカマイシンに接触することで耐性増強のため重複を起こす組換え (非相同性および相同性) が起こったとされる⁵⁾。遺伝子増強効果 (gene dose effect) を期待する手法として他の応用がまたれる。つまり形質転換法が細胞を Ca^{++} 処理したり、プロトプラスト (スフェロプラスト) 化することで従来期待できなかった菌種にも適用できるようになったので、薬剤耐性を選択圧の対象とし、付随する、あるいは耐性遺伝子近傍の DNA 配列を重複、増強する試みが開けたのである。ケモスタットを用い、選択圧をかけて遺伝子増強が可能になった例では、おそらくこのような DNA 組換えが生体内で進行したものと考えられる⁶⁾。ツニカマイシン耐性遺伝子とアミラーゼ構造遺伝子の距離関係は偶然ではあったが、積極的に DNA 配列を染色体レプリコン内に取り込ませて選択圧により重複、増強効果を求められよう。

限定された遺伝情報の改変

今まで述べたように一般に微生物を材料としたとき、遺伝情報を付与する方向はむしろ稀で、それまでその生物種が保有していた遺伝情報内での改変を試みるのが主力であった。いわゆる変異株の検索である。いろいろな変異原処理によって目的産物の生産性の増強をはかることは、日常に当然のごとく試みられ、そしてそれは効果を期待できるものであった。最も良い例としてペニシリン生産菌、*Penicillium chrysogenum* がある。Fleming によって最初、*P. notatum* で発見されたペニシリンは、その後、感染症の特効薬として再評価され、ペニシリン生産菌の検索が積極的に推進された。そして米国、ペオリア市の主婦が提供したクワンタローブメロンに着生した株が親株となった。全世界のペニシリン生産菌はこの系統であり、1 U/ml であった力価は 10,000 U/ml 以上にまで改良されている。しかし、変異株を得る各段階でどのように遺伝情報が改変されたか、なにゆえ、それによって生産性が上昇したかは追究されなかった。これは当時の科学レベルではやむをえなかった。同様な例としてストレプトマイシンをはじめとする抗生物質の生産性増強が行なわれてきている。

これらの例では外部から DNA 情報、素材を加えていないから、あくまでも限定された遺伝情報内での改変によっている。塩基配列の変化によって惹起された分岐合成系の不活性化、生合成関与の酵素構造遺伝子の改変、

その遺伝子の発現を抑制する機構の解除などのほか、炭素源、窒素源の効果的吸収、生産物の分泌促進などいろいろな要素が生産性向上に考えられる。変異原には γ 線などの電離放射線のようにかなり無差別に DNA 分子傷害を与える場合もあるが、紫外線のようにピリミジン 2 量体、それもチミン 2 量体を主として生成するなど、標的構造が特異性を帯びている場合があるので、1 種の変異原のみの処理でなく、複数種の変異原が有効になるが、もとより DNA 塩基配列がすべて解明されているわけではないから、試行錯誤を行なうよりほかはない。DNA 傷害を与えることにより、それを修復する過程で誤りが惹起されると考えられているが、それ以外にも組換え機能が誘導されるので、重複なども含めた DNA 再編成が促進された結果を得ていることもある。

抗生物質などの 2 次代謝産物は構造的に特異な母核を持つものが多く、代謝の調節現象や機構が知られていても、その知見を生産能増大に利用しているのは少ない。一方、アミノ酸の場合は生合成過程がよく知られ、種々の調節機構が調べられている。したがってアナログ化合物に耐性の変異などを目標として生産性増大を図ることも十分に利用されているが、複雑な化学構造ではそのアナログ化合物を合成すること自身が難しく、代謝調節を中心に考えた戦略はまだ未熟であると考えられる。

プラスミド支配の代謝能

細胞を宿主とする寄生体でも、宿主に顕在的な害を与えるウイルス、ファージは歴史的にもかなり以前から認められていた。これに反して同様に宿主に寄生するプラスミドは、たとえそれが表現形質に差が認められていても潜在的な存在であった。細胞を規制する主染色体 DNA とは物理的に独立して保持され、遺伝するプラスミドの分離、分析法が進み、実験室的な培養では必須ではない遺伝情報を担ってはいるけれども、自然界の多種多様な環境下に適応して生息するのに格好な遺伝情報を宿主に付与している場合がきわめて多いことが、ことに原核生物において示されてきた。

プラスミドの担う遺伝情報はまことに多種多様で⁷⁾、その中には宿主細菌の分類上の重要な指標に用いられているものもある。たとえば豆科植物に共生する根粒細菌の宿主選択性、根粒形成能、窒素固定能がプラスミド支配であることが示されている。これは *Rhizobium* 細菌が根粒形成で窒素固定を行ない共生するのに宿主によって感染性が異なり、それを指標として分類している方針を根本的に見直す必要を意味している。その他 *E. coli* にクエン酸資化能を付与したり、放線菌の気菌糸形成な

ども従来の分類上の基準に触れる性質のものである。

DNA 情報として表現形質に結果として影響を与えるのは酵素を含めたタンパク質の構造遺伝子であり、その発現によって代謝の流れが変わり、宿主の特性が変わる。プラスミド保有か否かで差がつけられ、プラスミドの種類によって違いが認められる。多くの植物で異なった症状を示す病原菌に *Fusarium oxysporum* があるが、分類すると同種としか判定せざるをえないそれぞれの単離株の感染スペクトラムが異なるのは、やはり主染色体 DNA 以外の遺伝情報によるのではないかと考えられるが、今ひとつ明確ではない。いずれにせよ種特異性でなく株特異性を示す原因の一つにプラスミド獲得がある。

株特異性を示す実例として抗生物質生産性がある。ある種の抗生物質が種を超えて生産菌株が得られる一方、同種と判定されてもまったく異なった抗生物質を生産する。しかもその生産性はしばしば不安定であって、生産力価が低下した株を旧に戻すことは、きわめて困難であって、これは抗生物質生産現場での切実な悩みといえるまでになっていた。このような株特異性と不安定性はプラスミドのように物理的に独立した遺伝因子があって、しばしば自然に消失することもある観察と一致する。そして 1 次生産物ではない 2 次生産物であることから主染色体情報ではないのではないかと考えが出された⁸⁾。抗生物質生産能は菌株特異性で消失しやすいほかに、そのような非生産となった株が生産株と比べると生育が劣るわけではなく、むしろ優れる場合があり、これは生育生存上に必要物質でないことを示す。また生合成経路では 1 次代謝上の分岐点から派生し、しかも生産菌の生育が最盛期を越したあたりから生産が始まるなどの特徴を示す。

このような特徴を遺伝情報構成から考えると、関連する遺伝子が群 (cluster) を成して、要すれば多遺伝子、あるいは多シストロンともいうオペロンで同時に発現制御できる機構が想定されやすい。このような多遺伝子オペロンは原核生物での特徴の一つであり (真核生物では例外的である)、1 次代謝産物であるアミノ酸生合成系は腸内細菌でほとんどの機構を取り、環境の変化に対してよく制御をうけている。また *Klebsiella pneumoniae* の窒素固定遺伝子 (*nif*) は 17 個が群を成し、7 個のオペロンに分かれているが、その全体を A (アクチベーター)、L (リプレッサー) が制御し、窒素代謝、酸素の存在などに対応している⁹⁾。また *Pseudomonas putida* での、いわゆる分解系プラスミドでは、代謝経路を構成する酵素群が、やはり多遺伝子オペロンで制御されている¹⁰⁾。しかしプラスミドにこのような代謝経路

がそっくり群を成して取り込まれているのは自然界単離での例が少ない。そして抗生物質生産菌でのプラスミド検出は数多くされたが、プラスミド上に生合成系路の酵素が情報化している確実例は少ない¹¹⁾。逆に主染色体上に生合成系の酵素情報が存在し、しかも群を成している例が示されている¹²⁾。しかし抗生物質の生産性を論ずるとき生合成系路の遺伝情報のみを取り上げるのは不十分で、その目的抗生物質への自己耐性機能がプラスミド支配である例がある¹³⁾。また抗生物質を細胞外に分泌する機能がプラスミドに保持されていてもよい。いずれにせよ抗生物質生産性とプラスミド機能の関係は、ずばっと両断できるような様相ではないが、生産性を上げる要素を含んでいることもあるといつてよいだろう。

試験管内遺伝子操作

生物の遺伝情報が DNA という化学物質であることが明確になったのは、たんに抽出、精製して化学的性質が判明したというのではなく、それを生細胞へ再び戻して遺伝形質が発現することを確認できたからである。これは何でもないことのようにだが生物を非生物と区別する基本的なことである。実際に生細胞が外部の DNA を取り込むことができる現象が知られなければ最近の遺伝子操作と称する分野は発達しえなかった。

プラスミドが物理的に独立して細胞に維持されることは、プラスミドが自律的に増殖し、細胞分裂に際して分配してゆくことである。この機能にあずかる遺伝情報がプラスミドをしてプラスミドたらしめる要素であって、あとのもろもろの形質は付随的なものにしかすぎない。実際に機能的にも構造的にも最小単位とみられる小さなプラスミドが自然界から分離されており、それらは安定に遺伝してゆく以外に表現形質を示していない。

このようなプラスミドの基本的構造に付随的に、人工的に遺伝形質を加えてやれば、その形質が発現したときに宿主に害を与えない範囲で、宿主がそれまで持っていなかった性質を生みだすことができる。遺伝形質を宿主に持ち込み、保持させるのがベクター (vector) であって、プラスミドやファージ (ウイルス) が用いられ、ベクターに遺伝形質を持ち込ませるのを試験管内で酵素などを用いて行なうので一般に試験管内 (*in vitro*) 組換え DNA 実験と称している。この事柄については今までに多くの総説、解説、各論などが出されているので要点のみを記したい。

構造遺伝子をきめるアミノ酸暗号は地球生物では共通である。ただし哺乳類ミトコンドリアでは多少部分的に異なっている (表 1)。そして 1 アミノ酸 1 暗号の場合も

表 1 細胞の塩基 3 文字アミノ酸暗号

UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys
UUC "	UCC "	UAC "	UGC "
UUA Leu	UCA "	UAA Ter	UGA <u>Ter</u>
UUG "	UCG "	UAG "	UGG Trp
CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg
CUC "	CCC "	CAC "	CGC "
CUA "	CCA "	CAA Gln	CGA "
CUG "	CCG "	CAG "	CGG "
AUU <u>Ile</u>	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser
AUC "	ACC "	AAC "	AGC "
AUA <u>"</u>	ACA "	AAA Lys	AGA <u>Arg</u>
AUG Met	ACG "	AAG "	AGG <u>"</u>
GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly
GUC "	GCC "	GAC "	GGC "
GUA "	GCA "	GAA Glu	GGA "
GUG "	GCG "	GAG "	GGG "

表中で囲った暗号は哺乳類ミトコンドリアでは別の意味になる。AUU, AUA, AUG: 開始暗号, AUA: Met, UGA: Trp, AGA, AGG: 終止記号。

あるが、多くは 2~6 暗号であって、タンパク質により使い方に違いがある¹³⁾。したがって化学合成でその宿主にとって最も効率よいと考えられる塩基配列を特定のアミノ酸組成に対して設計することも可能であるが、これは厳密な証明はされていない。情報中間体である mRNA は 1 本鎖だが、分子内対合でヘアピン構造など 2 次構造を生みやすく、このような 2 次構造が転写開始や継続に大きな影響を与えることがしだいに認められてきている。現在ではまだ未解決であるが、たんに DNA 配列でなく RNA 配列の面からも将来は顧慮する必要があるだろう。

細胞の持つ遺伝情報は一時に全部発現するとは考えられない。細胞の置かれた環境に従って細胞経済が成立たつためにも適時に適当な情報が適宜に発現して全体の調和がとれる方向に運転されているのであろう。したがって個々のオペロンがよく制御されていると考えられるが、細胞 1 個の中では中央統制制御のような機構はなく、それぞれのオペロンの発現の強弱がかなり働いていると見られる。E. coli のある種のリポプロテインは細胞表層に 7.5×10^5 分子存在するが、これは 1 分裂の間に 7.5×10^5 分子を新たに補給することを意味し、きわめて強力なプロモーターの支配下において RNA ポリメラーゼによる転写開始が効率よく行なわれている¹⁴⁾。一方、DNA ポリメラーゼ I は DNA 複製、修復に働く



図1 大腸菌 DNA Polymerase I のプロモーター区分⁹⁾

タンパク読みはじめ以前をマイナス表示。1本鎖のみ示す。転写開始点は未定。S.D. は3文字のみ、Pribnow 配列の上流に明瞭な有意の-35位を中心とした識別配列がない。

必須の酵素である。複製は細胞分裂周期と同調しているが、修復は、いつ起こるかわからない DNA 損傷に即応するために常時 200~400 分子を細胞内に保ち、1分裂ではその分だけ補給すればよい。DNA 塩基配列の上からも DNA ポリメラーゼ I オペロンのプロモーターは常時機能してはいるが、きわめて弱いと判断される¹⁵⁾ (図1)。オペロンの発現をオペレーター、アクチベーターなどの機構で制御する方式のみで構築されているのではなく、自然にバランスがとれるような仕組みがあると考えてよい。事実、必須である DNA ポリメラーゼ I 遺伝子を多コピーベクターでクローン化すると菌は生育しない。遺伝子に変異があり、欠損タンパクとするとクローンできる。また部分的な酵素標品である Klenow 断片のみの DNA 部分をクローン化すれば、量産が可能になる¹⁶⁾など、必須な酵素であっても多いほど細胞は益するものではない。

構造遺伝子を発現するためのプロモーター構造が細胞にタンパク質を生産させるのに重要なことは申すまでもない。RNA と同時に転写を終結し、ポリメラーゼを脱離するターミネーターの重要性が認識されてきている。ターミネーター機能が不完全なとき読み流し (read through) によって下流情報が弱いながらも転写される。情報発現のバランスをとるために、このようなシステムが自然に生かされている場合もありえよう。しかし、外部から導入した遺伝子を意識的に発現させるときには無駄な仕事や材料の浪費は細胞にとっても不利益を増やすしかないであろう。

必須な酵素も不必要に増産すると不利益を齎すならば、もともと不利益の要素を持つ異種タンパクの量産をいかに考えるか。情報発現制御を行なって細胞の増殖と切離して、一気に量産させるか、絶えず細胞外へ分泌して細胞内での濃度を低く抑えることなどが考えられよう。細胞内では不必要タンパクは分解傾向にあるので、増殖に伴ってゆっくり生産させるのは増殖速度の点でも得策ではない。分泌させる場合でも培養液中での安定性が問われるが、これは将来、固定化菌体などの解決策も

ありうるし、すでにその試みはされている¹⁷⁾。いずれにせよ、タンパク分子を欠落アミノ酸のわずかの差で分離精製するのはきわめて困難である。また検定や精製過程での免疫抗体の使用に誤りを生ずる。効果的な発現制御、つまりスイッチ機能や分泌ベクターの開発に熱が入っている。

細胞内に目的タンパク質を多量蓄積できた場合、菌体を何らかの方法で破壊し、可溶成分を精製操作に向けなければならない。とくに純度を要するときはこの段階が全体の生産性に著しく影響を与えよう。ところがタンパクによっては細胞内で顆粒 (inclusion) を形成することが次第に報ぜられるようになった¹⁸⁾。すべての例に通用しないようだが、その差が何によって支配されるかは不明である。しかし顆粒を形成することでむしろ他成分との分離が容易となり、精製効率が上昇する場合もでてきている。これはまったく図らずもそのような顆粒形成現象が惹起されたことによるが、顆粒そのものは不活性型であることが多く、それからの再生法の検討が必要である。この点に関してのタンパク質化学は未踏に近い。今までにそのような顆粒形成現象が起こる条件は知られていなかった。

導入したベクターの宿主増殖における安定な保持も解決する必要がある。多コピーベクターの場合は細胞分裂に際し、たとえ均等に分配されなくともベクター増殖が十分に分裂に嚙合っていればとくに問題はないと見られていたが、やはり徐々にベクター消失が起こるのは防げない。少数、あるいは単位コピーベクターではむしろ安定に配分される仕組みがしだいに明らかになっている。同様な仕組みは多コピーベクターでもあるようでそのことを考慮に入れるようになってきている¹⁹⁾。いずれにせよ薬剤選択圧をかけて安定性を図るのは生産上好ましくはない。ベクターに宿主菌が必須である情報を組み込んでおく方法も開発されている。また安定性を増す DNA 因子がある²⁰⁾。

ベクターの安定保持ができてもそれに持たせた希望の遺伝情報が安定に保たれるわけではない。付与する遺伝

情報の質にもよるが、不変の DNA 配列としておくのに内因的な選択圧は望めない。これはおそらく引き続いての課題になるであろう。DNA 再編成は繰り返し DNA 配列などの存在で促進されるが、目的の遺伝子近辺にこのような要素があると不安定性は増加すると考えられ、またそのような指摘もある。

いろいろ細かい問題もあるが、一種の、あるいは少数のタンパク、ペプチドの生産菌を試験管内組換え DNA 法で得ることは方程式化してきている。ただし、場合によっては現在の主力である *E. coli* 以外の菌種を用いるほうがよい。血清肝炎 B 表層抗原は *E. coli* では効率が低く、*Saccharomyces cerevisiae* で成功している。*B. subtilis* 系もしだいに開発されているが、今後さらに他菌株での開発が進められなければならない。*Streptomyces* 属がその好例である。

生体内遺伝子操作

試験管内組換え DNA 法のみでは現在のところベクターレベルでのことで、プラスミドでも 100 Md 以上の巨大なものでは取り扱いにくい。細菌の主染色体 DNA ともなれば事実上行なわれていない。そして今ひとつの問題として、細胞外で編成した DNA が希望どおりに細胞内で安定に具現化するかということである。いわば青写真どおりに生体が応じてくれるかである。その意味では細胞に「あなたまかせ」のことが最終的に存在しているともいえよう。

生体内で相同性配列のある DNA 鎖同士で起こる組換えは、とくに相互乗換えは古くから現象的によく知られており、真核生物 2 倍体の相同染色体間でよく観察されていた。形質転換など原核生物の遺伝子交換も結局はこの方式であって、代表研究例によく *E. coli* の *rec A* 遺伝子関与のものがあげられる。相同性組換えは遺伝子交換、不平等相互組換えが別個にある。ところが相同性配列はあってもごく短いもの同士で起こり、しかも *rec A* 遺伝子の支配をうけない部位特異的組換えが知られ、また DNA 鎖上を転移する可動遺伝子 (Mobile genetic element) が生物一般に知られるようになった²¹⁾。さらにまったくの非特異的組換えも認められている。相同性配列同士の間で進められ、従来から観察されていた組換えを普遍的 DNA 組換えというのに対し、後者を「不法」の組換え (illegitimate recombination) と呼ぶことがある。相同性の有無にかかわらず、これらの機構によって DNA 再編成が常に起こりうる、それが生物進化の一大動因であり、また自然発生的生物スイッチとして働いていると考えられてきている。

生体内 DNA 組換えと DNA 再編成については別に企画されているので²²⁾、ここでは、最近 10 年間に著しく利用されてきている生体内 DNA 組換えと試験管内 DNA 組換えの組合せによる遺伝情報付与について触れたい。これらの実施例はすでにかかなりの数にのぼるが、*E. coli*、*B. subtilis*、*Saccharomyces cerevisiae* など一般的的主要菌株に集中しているのは遺伝学的背景の強いものが代表例として扱われやすい傾向としてやむをえないが、*Rhizobium*、*Agrobacterium* のように遺伝学的背景の弱いものにも応用されるようになった。むしろ遺伝学的背景が弱く、他の技法が使いにくいので積極的に利用されてゆくであろう。ここでは原理的な代表例をあげておく。

Mu フェージはトランスポソンの一種とも考えられ、一見無差別なまでに DAN 配列の中に転移、挿入する。この性質を利用して変異株造成や遺伝子解析が行なわれるが、遺伝子融合、遺伝子連結と呼ばれる手法はユニークな性格をもつ^{23,24)}。いまある遺伝子 X のプロモーター P_x を他の遺伝子 Z の構造遺伝子 S_z を連結しようとする。X と Z の間に DNA 相同性がなければ非特異的組換えでしか起こりえない。ところが挿入配列として Mu を X、Z 遺伝子それぞれに入れると相同性区分が生じ、相同性組換えが起こり、組換えられた Mu をはさんで X と Z を連結できる。ついで Mu を脱離させると P_x と S_z は直結する (図 2)。フェージ Mu の宿主域は *E. coli* を中心として狭いが、薬剤耐性トランスポソンを用いた例もある。β-ガラクトシダーゼの構造遺伝子 *lac Z* を他のプロモーターに連結してプロモーター機能を解析した例が多い。これは *lac Z* に関する知識が豊富で使いやすいためである。*lac Z* 遺伝子の直接上流に Mu フェージ末端断片が入った DNA 区分を λ フェージに組み込む (試験管内操作で変法が可能である)。*lac* 遺伝子

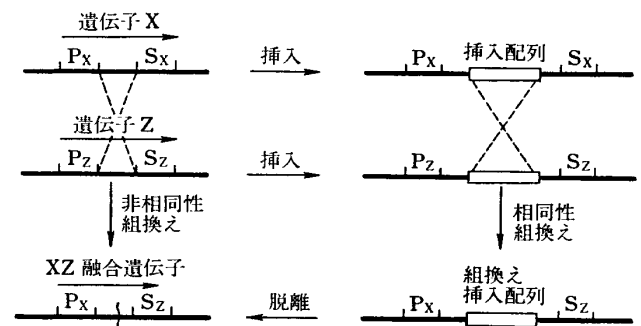


図 2 遺伝子 X、Z の融合

挿入した DNA 配列での相同性組換えを利用する。 P_x : 遺伝子 X のプロモーター、 P_z : 遺伝子 Z のプロモーター、 S_x : 遺伝子 X の構造遺伝子、 S_z : 遺伝子 Z の構造遺伝子。

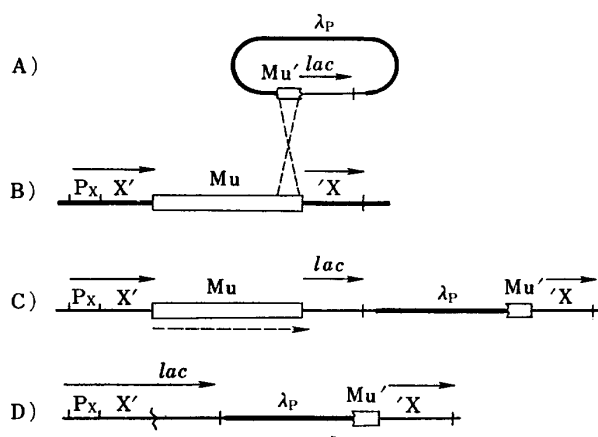


図 3 Mu フェージを相同性領域とする遺伝子融合
 A) λ_p ($lac::Mu$) より Mu 挿入近傍の lac 遺伝子および Mu ゲノム末端の DNA 領域 (Mu') を λ に組み込み, λ_p ($lac::Mu'$) とする. B) lac 遺伝子欠損の宿主菌を Mu で溶原化, lac 遺伝子を融合したい X 遺伝子プロモーター P_x の近傍に Mu が挿入した株を選出, この株に λ_p ($lac::Mu'$) を感染, 相同性組換えを起こす. C) Mu プロフェージの両端を P_x と lac ではさむ組換え体, Mu の存在で lac は発現しない. D) Mu の脱離で P_x と lac が融合, P_x の作用で lac が発現する.

欠損で λ フェージ組込み箇所のない *E. coli* 宿主に上述の λ_p ($lac::Mu'$) を導入すると, Mu DNA の共通区分以外には相同性がないので, その箇所に組換えが起こり組み込まれる. $lacZ$ の発現は Mu がはさまれていて起こらない. Mu が脱落したときのみ $lacZ$ は発現し, また Mu の誘発にも耐性である (Mu *cts* を用いているので熱誘発での生残菌を拾う). この方法で遺伝子産物の量の少ない, また測定しにくい遺伝子の発現の仕組みが精査されるようになった. また λ を誘発すれば融合遺伝子を含む形質転換用のフェージが得られる (図 3).

B. subtilis は組換え DNA 法の宿主として開発が急がれていたが, 元来が生体内組換え能が強いためか, プラスミドベクターによる遺伝子付与は安定性が悪いという欠点がある. ところが宿主染色体に組み込まれたプロフェージゲノムへの組換えを経て特殊形質導入フェージを造成し, それをさらに宿主染色体に組み込んで, 目的遺伝子をクロニングする prophage transformation 法が効率よく用いられている²⁵⁾. 遺伝子増強はされないがかえって安定なクローンが得られやすい²⁶⁾. フェージ ρ 11 の共通相同性区分を利用して相同性組換えをさせる例である.

主染色体 DNA への相同性組換えを利用した外部からの DNA 付与は形質転換法のようにとくに目新しいものではないが, 従来の形質転換がただ漫然と全 DNA から成る偶発的断片を扱っていたのに比べ, 試験管内 DNA

組換えを経ることで, 目的の DNA 領域のみを取り上げる, つまり濃縮を前段階に持つることになった. *Rhizobium* 属細菌は豆科植物に共生し, 根粒を形成して窒素固定を行なうが遺伝学的知見は少なく, また通常, 窒素固定能は共生のときに発現するので植物に接種テストを行なって結果を判定する大変に手間のかかる仕事を要求されていた. 一方, *Klebsiella pneumoniae* の *nif* 遺伝子はかなり早い時期に生体内組換え法を活用してクローン化されていた. この両菌の *nif* D.H は似ており, DNA 交雑で *R. meliloti* の DNA 断片 (*Eco*RI 処理, 3.9 kb) を選び, *E. coli* でクローンできる. *nif* 遺伝子領域に薬剤耐性トランスポソン Tn 5 を転移させ, 薬剤耐性を選び, グラム陰性菌の広宿主域ベクター pRK 290 に組み込む. pRK 290 は自己伝達性ではないが, 自己伝達機能 *tra* 遺伝子を狭宿主域 ColE 1 に組み込んだベクター (pRK 2013) 保持菌をヘルパーとして *Rhizobium* 細胞に送り込める (ただし pRK 2013 は *Rhizobium* では保持されない). *nif* D.H 遺伝子領域に関しては送り込んだ DNA はまったく相同性であるので, Tn 5 の薬剤耐性で選べば, 指定場所に Tn 5 による変異を起こした *R. meliloti* 株が選べる²⁷⁾ (図 4). グラム陰性菌に通用でき, *E. coli*/pRK 290, *E. coli*/pRK 2013, 目的菌株を混合してプラスミド伝達を行なうところにも特徴がある. これを tri-parental 法と呼んでいる.

上述の方法とまったく同じ原理, 考え方で *Saccharomyces cerevisiae* でも遺伝子置換ができる. 酵母での形質転換が可能になって以来, この真核生物にも原核生物なみの技術が急速に応用できるようになった. 主染色体 DNA 内に遺伝子を置換することは, 多コピープラスミドを担体とするときのように遺伝子増強効果をただちに望むことはできないが, 安定に保持させることが期待できる. トランスポソンあるいは挿入配列を両端に持たせて, 付加 DNA 自体をトランスポソン化して転移させることも試みられているが, この場合には再び転移, 脱離しないような工夫が必要となる. 同種同株の DNA 断片そのものを担体とすれば, 主染色体ゲノムのその場所を指定して遺伝子を付加できるわけである²⁸⁾, さらに真核生物主染色体の特徴である動源体 (centromere) やテロメア (telomere) 断片に自律増殖配列 (*ARS*, autonomous replicating sequence) を組み合わせ, それに十分な大きさの DNA 断片を組み込んで主染色体の増加ができるようになった²⁸⁾. これは原核生物では一般にゲノムはプラスミド, 主染色体を問わず, 環状であることで終始するのに, 真核生物では線状ゲノムが主染色体の特徴であるため, 従来は環状でしか調べられなかった DNA の諸性

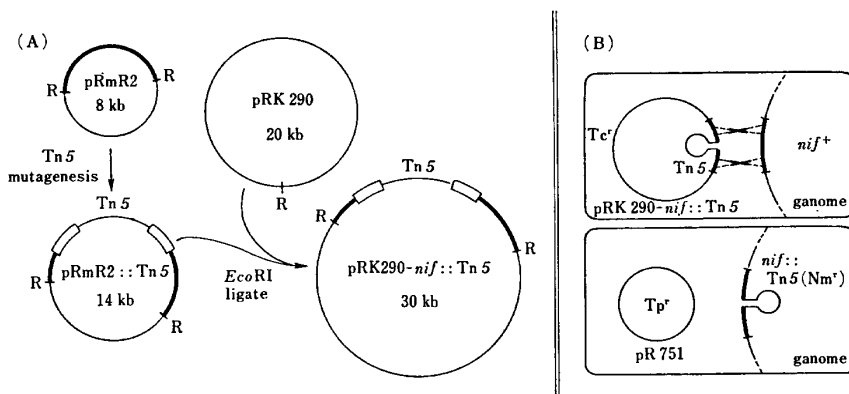


図4 場所指定の Tn による変異付与の概念図

(A) *E. coli* を宿主として、あらかじめ得た *Rhizobium* の DNA 断片を持つプラスミドに Tn 5 を挿入し、IncP 1 群の自己伝達性プラスミドと組み換え、*E. coli*/pRK 290-*nif*::Tn 5 を得る。(B) このプラスミドは自律伝達性はないので別途に *E. coli*/pRK 2013 を用意し、*Rhizobium* へ他律伝達させる (triparental 法)。同じ P 1 群プラスミド pR 751 を導入、不和合性により、薬剤耐性で選択して共通領域での相同性組換え体を得る。Tn 5 により変異が付与される。

質を、線状で調べられる特色をもあわせ持つことになる。プラスミドやファージで線状のものが知られているが、主染色体 DNA のテロメアとは異なり、末端には特異なタンパクが結合しているため単純には比較できない²⁹⁾。

今後も試験管内 DNA 組換えと生体内 DNA 組換えは相補し合ってその特色を発揮するであろう。

放線菌類の遺伝子操作

2 次代謝生産物に触れるならば、いかにしても放線菌類を語らねばならない。抗生物質をはじめとする生理活性物質の多くはこのグループおよび近縁の菌株から得られているのは周知の事実である。しかしながら従来は生産物にのみ関心が集まってこれらの菌群の遺伝学知見はえようともされなかった。また細菌とはいえ、その特異的な生育形態もあって遺伝学的研究を進めるには困難もあったといえよう。英国の Hopwood が放線菌での伝達性プラスミド SCP 1 の存在を唱えて以来、急速に研究は進歩し、宿主-ベクター系も開発され、抗生物質合成系のクローニングも増加しつつある。ただし興味あることに SCP 1 は未だに物理的に確認されていない。おそらく 200 kb 以上の巨大プラスミドであろうと予想されたりもする³⁰⁾、放線菌から線状プラスミドが単離されている例もある³¹⁾ことを知っておきたい。線状ではアガロース電気泳動で挙動が環状とは異なり、大きめの DNA は移動しないので見つけにくい。このプラスミドも両端にタンパク質が結合している³²⁾。

プラスミドベクターとして著名なのは *Streptomyces*

lividans 66 由来の SLP 1.2 を母材とした pIJ 61, pIJ 41 がある。これらは *S. lividans* のほか *S. coelicolor* A3(2) など狭い宿主域でコピー数は 4 程度である。一方、広宿主域で多コピーのベクターに pIJ 702 などがある。いずれもチオストレプトン耐性やアミノグリコシド耐性などの遺伝子をマーカーに用い、*E. coli* 系で行なわれる操作とほとんど同様に用いられる。形質転換をプロトプラスト法で行なうため、それからの細胞再生の効率が大きく影響する。抗生物質合成系はクラスターを成しているものが多いようで、アクチノロージン (actinorhodin) 合成系がクローンされている³³⁾。また生合成系への流れを増強する目的でキャンディシジン (candicidin) への分岐酵素である PABA 合成酵素がクローンされている³⁴⁾。全般的な総説を参照されたい^{11,35,36)}。

溶原ファージ ϕ 31 からベクター ϕ 31 K 400 が開発されている。 ϕ 31 の宿主染色体 DNA へ溶原化する部位の DNA 配列を含めた非必須領域を欠損させ、そこに viomycin phosphotransferase (vph) 遺伝子と *E. coli* pBR 322 全域が置換されている。このため K 400 は *E. coli* で増幅することができ、そのままでは *Streptomyces* 菌に溶原化しない。pBR 322 領域を制限酵素 *Pst* I 処理で除き、クローン目的菌 DNA の *Pst* I 処理断片を組み込ませる。*S. lividans* を便宜的な一般宿主として形質感染させ、生じたプラークを DNA 供与菌胞子を播いた平板にレプリカする。ここで DNA 供与菌は ϕ 31 K 400 由来ファージと相同 DNA 区分を持つことになり、生体内組換えで溶原化し、viomycin 耐性で選択できる。交差した部位により主染色体オペロンの発現は影響をうけ、

一般には極性効果を示して生合成変異株が得られる。これは変異クローニング (mutational cloning) と呼ばれ³⁷⁾, $\phi 31$ の宿主域が広いので今後よく使われるであろう。メチレノマイシン (methylenomycin) 生合成系が SCP 1 よりクローンされている³⁰⁾。

2 次代謝生産物は培養後期で生産されるのが一般的である。個々のオペロンがそのように発現制御されているとしても、そのみでなく全体的に細胞の生理的状态を制御する機構を考えても不思議ではない。その意味では放線菌のホルモンとも目される A ファクター (Auto-regulating factor: 2-isocapryloyl-3-R-hydroxymethyl- γ -butyrolactone) およびその生産機構は注目に値する³⁸⁻⁴⁰⁾。そして A ファクター生産制御に関する遺伝子がプラスミド由来の様相を示す菌株もあることから、しばしば抗生物質生産現場で認められる生産不安定性の一因ともなりうる。放線菌は細菌の中でもかなり分化が進んでいると見られるので、今後もこの方向での検討は基本的に要求されよう。

今ひとつ、放線菌の生産不安定性の原因に考えられるものに DNA 再編成がある。生体内組換え機構がしだいに明らかにされるにつれ、放線菌の中には繰り返し DNA 配列を多く含むものが認められてきている⁴¹⁾。目的遺伝子群のクローニングによる遺伝的強化のみでなく、宿主としての適合性もあわせて検討されなければならない。

おわりに

生物の機能をより高め、利用してゆくには未だ潜在的な未知の機能の検索とともに、遺伝子を付与してゆく方向の育種を考えてゆく必要がある。そして微生物についてみれば *E. coli* で代表され、開発された技術を“餅は餅屋”の各種微生物に適用、開拓する時期に入っている。さらに実際の工業生産に移すとき、社会一般に漠然とした不安感が未だに残っていると見られる。これは日進月歩のこの分野を理解すること自体が困難なこともあるが、科学者、技術者が従来、ややもすれば自閉的であったことにもよるのではないか、今後の微生物由来農薬の開発と利用に対して、心してゆかねばならない問題である。

引用文献

- 1) 米山勝美, 若林 攻: 農薬誌 **9**, 181 (1984)
- 2) C. Ishitani, Y. Ikeda & K. Sakaguchi: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2**, 401 (1956)
- 3) 山田康之: バイオテクノロジーの新展開, 化学増刊 **103**, 137 (1984)
- 4) 丸尾文治: 農化 **50**, R 133 (1976)
- 5) 田村学造ほか: 日本分子生物学会昭 59 大会口頭発表
- 6) R. P. Anderson & G. R. Roth: *Ann. Rev. Microbiol.* **31**, 475 (1977)
- 7) 矢野圭司: 発酵と工業 **39**, 2 (1981)
- 8) 梅沢浜夫: 科学 **46**, 130 (1976)
- 9) F. M. Ausubel: *Cell* **37**, 5 (1984)
- 10) M. Worsey & P. A. Williams: *J. Bacteriol.* **124**, 7 (1975)
- 11) 岡西昌則: 日本農芸化学会 ABC シリーズ 1, 日本農芸化学会編, 朝倉書店, p. 111, 1983
- 12) F. Malpartida & D. A. Hopwood: *Nature* **309**, 462 (1980)
- 13) T. Ikemura: *J. Mol. Biol.* **146**, 1 (1981)
- 14) 中村研三: 化学と生物 **20**, 47 (1982)
- 15) C. M. Joyce, W. S. Kelley & N. D. F. Grindley: *J. Biol. Chem.* **257**, 1958 (1982)
- 16) C. M. Joyce & N. D. F. Grindley: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 1830 (1983)
- 17) K. Mosbach, S. Birnbaum, K. Hardy, J. Daires & L. Bülow: *Nature* **302**, 543 (1983)
- 18) 別府輝彦: バイオテクノロジーの新展開, 化学増刊 **103**, 45 (1984)
- 19) C. A. Miller, W. T. Tucker, P. A. Meacock, P. Gustafsson & S. N. Cohen: *Gene* **24**, 399 (1983)
- 20) G. Edlin, R. C. Tait & R. L. Rodriguez: *Bio-technology* **2**, 251 (1984)
- 21) J. A. Shapiro ed.: “Mobile Genetic Elements,” Academic Press, New York, 1983
- 22) “可動遺伝因子と DNA 再編成” シリーズ, 化学と生物 **22**, No. 10 (1984) より連続掲載
- 23) M. J. Casadaban, T. Silhavy, M. L. Berman, H. A. Shuman, A. V. Sarthy & J. R. Beckwith: “DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes,” eds. by A. I. Bukhari, J. A. Shapiro & S. L. Adhya, Cold Spring Harlor Lab., CSL, New York, p. 531, 1967
- 24) 室岡義勝: 化学と生物 **20**, 265 (1982)
- 25) 河村富士夫: 遺伝子操作, 松原謙一, 矢野圭司編, 共立出版, p. 197, 1981
- 26) 山根國男: 化学と生物 **21**, 659 (1983)
- 27) G. B. Ruvkun & F. M. Ausubel: *Nature* **389**, 85 (1981)
- 28) K. Struhl: *Nature* **305**, 391 (1983)
- 29) Y. Kikuchi, K. Hirai & F. Hishinuma: *Nucleic Acids Res.* **13**, 5685 (1984)
- 30) K. F. Chater & C. J. Bruton: *Gene* **29**, 67 (1983)
- 31) T. Hayakawa, T. Tanaka, K. Sakaguchi, N. Ôtake & H. Yonehara: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **25**, 255 (1979)
- 32) H. Hirochika & K. Sakaguchi: *Plasmid* **7**, 59 (1982)
- 33) F. Malpartida & D. A. Hopwood: *Nature* **309**, 462 (1984)
- 34) J. A. Gil & D. A. Hopwood: *Gene* **25**, 119

- (1983)
- 35) D. A. Hopwood, M. J. Bibb, C. J. Burton, K. F. Chater, J. S. Feitelson & J. A. Gil: *Trends Biotechnol.* **1**, 42 (1983)
- 36) J. F. Martin & J. A. Gil: *Biotechnology* **2**, 63 (1984)
- 37) K. F. Chater & C. J. Bruton: *Gene* **25**, 67 (1983)
- 38) 堀之内末治, 別府輝彦: *化学と生物* **22**, 209 (1984)
- 39) O. Hara, S. Horinouchi, T. Uozumi & T. Beppu: *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2939 (1983)
- 40) S. Horinouchi, Y. Kumada & T. Beppu: *J. Bacteriol.* **158**, 481 (1984)
- 41) "Genetic Rearrangement" The 5th John Innes Symp., eds. by K. F. Chater, C. A. Cullis, D. A. Hopwood, A. W. B. Johnston & H. W. Woolhouse, Croom Helm, London, 1983