

## 〔総合発表会基調講演要旨〕

## 遺伝子農学を考える

向井 純一郎 (九州大学大学院農学研究科遺伝子資源工学専攻)

Jun-ichiro MUKAI: Place of Gene Technology in Agriculture (Laboratory of Molecular Gene Technics, Graduate School of Genetic Resources Technology, Kyushu University, Fukuoka)



ヒトは自然の中に生き、自然に働きかけて衣食住の糧を得、改良してきた。この過程において繰り返されてきた有用生物の飼養育成は必然的に個体レベルでの選抜育種にいたる広義の遺伝子農学と言うべきものであるが、本

論では、DNAの試験管内実験を含むもの、すなわち狭義の遺伝子農学に範囲を限って、動・植物、微生物の分野におけるトピックをいくつか拾ってみよう。

成長ホルモンは約140個のアミノ酸からなるペプチドであり、インシュリンやソマトスタチンとともに遺伝子工学が最も初期に成功した例である。さらにこれらのDNAをプローブとして多くの動物ホルモンの単離が行われ、家畜、水産動物の肥育への利用が始まっている。年間生産量1,500万トンに達するチーズの製造には、従来生後4週までの仔ウシの第4胃から調製される凝乳酵素キモシン(レンニン)が不可欠であったが、絶対量不足と資源高度利用の立場から代替酵素が求められ、糸状菌プロテアーゼが実用化されたが性能的に十分ではなく、ついに遺伝子組換技術によって仔ウシのプロキモシン mRNA→cDNA→組換DNA→微生物(細菌、イースト)形質転換→培養生産のみちが開かれ、実用化にいたった。この試みは日本、スイス、アメリカで独立に成功し、仔ウシを犠牲にしないチーズの生産が達成され、世界人類の食に対して大きな福音となった。ここに採用された方法は分化組織・器官におけるメジャーなmRNAを含む生体材料に対しては一般的に適用可能である。また、対象の部分アミノ酸配列がわかっている場合にも、逆演繹的にDNAプローブを人工合成して遺伝子を釣り上げ、組換体を作製利用することが可能である。

植物分野では、特徴的な全能性、クラウンゴール菌感染やそのプラスミドによる形質転換、RNAウイルスによるトランスフェクションに加えて、細胞壁溶解酵素の利用による直接的細胞融合が広く行われている。この中にはいわゆる昆虫卒倒菌の生産する毒素蛋白質遺伝子や、レポーター遺伝子としてのカナマイシン抵抗性遺伝子、ホタルシフェラーゼ遺伝子なども含まれている。変わったものとしては、組換プラスミドDNAの植物固体への直接注入やリーフディスクからの吸収・再生による方法がある。この方法の成功がターゲットの成育時期と部位

に大きく依存することは、植物発生学と分子生物学技術のドッキングの必要性を強く示すものであり、十分に考慮したい。今後は物質生産に関連する実用形質の改良、増強が期待される。RFLPと染色体工学技術がこれを加速することは必定である。

さて、現在は大気、水、土壌のすべてにおいて化学的劣化、汚染が進んでいる。この中で農業技術に起因するものに化学肥料、農薬の過用がある。また、重化学工業からの排気による酸性雨、化石燃料からのCO<sub>2</sub>放出による地球温暖化は急を要する課題である。遺伝子農学・農業はどう対処すべきであろうか? 微生物利用を中心にその一面を考えてみよう。

生物はすべて環境と対話しつつ生きているが、よく知られているものの一つに二大生体元素である窒素と炭素の供給・栄養に際しての緊縮制御がある。一般に窒素飢餓—直接的にはアミノ酸欠乏—に陥った細菌類では、uncharged tRNA・mRNA・ribosomeコンプレックスの形成によってribosome分画中の緊縮制御因子stringent factorが活性化され、その触媒作用ATP+GTP→AMP+GTP-3'-pp(→GDP-3'-pp+Pi)によって生成したGDP-3'-pp(ppGpp)が、特定の遺伝子群に対するRNAポリメラーゼの親和性を変更し、あるいは酵素活性に対するエフェクターになるなどの多彩な遺伝情報発現制御作用を発揮する。それらは一見相互に無関係ともみえるが、実はアミノ酸欠乏によって不可能すなわち不必要となった蛋白質合成や細胞分裂のためのルーチンの転写を停止し、さらには関連諸酵素の働きを抑えて浪費を防ぎ、耐乏的休眠を開始する一方で、手持ちのいくつかのアミノ酸オペロン、糖質化オペロンや酵素系を発動することによって代謝を変更し、よってアミノ酸欠乏に適応しつつそれから離脱しようとする典型的な多面的pleiotropic調節である。これを支配するstringent factorの遺伝子変異株ではppGppが合成されず、アミノ酸欠乏下においても浪費的な合成・代謝を継続し、さらなるピンチを招来することになる。また、この株でもその無細胞ライセートにppGppを添加すればin vitroにおいて緊縮制御を起こすことができることや、緊縮制御中の細胞に当該アミノ酸を与えると1~2分内にppGppが分解消滅(ppGpp→GDP+Ppi)し、正常な成育増殖が再開されることがわかった。その後窒素源だけでなく炭素源(糖)の過剰や、光合成菌においては減光時にもppGppプールの増加が観察されたことなどから判断して、ppGppは二大元素の供給、代謝においてpleiotropicなエフェクター

ないしはシグナル分子として根元的にかつ共軌的にかかわっていると見えよう。

話はここから始まる。数年前私達は一放線菌 *Streptomyces morookaensis* がその対数増殖期に、すなわちアミノ酸欠乏などの緊縮栄養が全くない条件下に、ATPヌクレオチド3'-ピロホスホキナーゼ (PPK) すなわちpppApp合成酵素を生産分泌することを知り、詳細な検討の結果それが前述のstringent factorと同じメカニズムによってATP, dATP及びATP-3'-ppの5'-β, γ-ピロリン酸基をATPのみならず多種多様のヌクレオチド、ヌクレオチド型補酵素、糖ヌクレオチド類の3'-水酸基に転移してppGppやその塩基アナログ類、そして各種の3'-pp型ヌクレオチド誘導体を生成し得ることを発見した。ここで一見奇異に思われることだが、この菌ではなぜppGppによる代謝の凍結が起こらないのか？ それは本酵素が分泌型だからである。そしてむしろこの特徴的性質のゆえに、本酵素の生理的意義として、環境との対応、細胞間対話、あるいはppGppのアナログ類について考えれば2次代謝や分化等をも含むより広範な代謝調節における役割が強く想像された。このことをいろいろの実験によって探ってみた。ppAppは他種放線菌、枯草菌などの胞子形成を誘導すること、そしてppGppの塩基アナログ類 (A, C, U) がいずれも大腸菌のライセート系においてrDNA, fDNAの転写に対する緊縮制御活性を全く持たないことも判った。NAD-及びFAD-3'-ppはそれぞれの活性を完全に失っていた。これに対して3'-pp型補酵素Aは正常型に比べて約2倍の活性を示し、特にそのアセチル体は、C4及びCAM植物でのCO<sub>2</sub>暗固定の律速酵素であるホスホエノルピルビン酸カルボキシラーゼを、正常のアセチル補酵素Aに比べて6~7倍も強くアロステリックに活性化した。それではこの遺伝子には何が期待できるか？ いかにも利用すべきか？ 微生物の代表選手とも言える大腸菌へのPPK遺伝子 (ppk) の導入と遺伝子発現への影響の検討をまず行った。はじめに*S. lividans*/pIJ699系によって生産菌からクローニングしたppk含有フラグメントをpUC系に組み換え、大腸菌に転換させたところ確かにAmp<sup>r</sup>, Xgalホワイトのコロニーを得、それらの中からIPTG誘導性の、抗-抗PPKウサギIgG ヒツジIgG-アルカリフォスファターゼ陽性のPPK生産株を得た。また、そのPPK酵素活性についても確認できた。この事実は、本来完全な分泌型だったこの酵素が大腸菌の中では、分泌シグナルの相異によるのか否かは不明としても、少なくとも部分的に貯留され機能することを示している。この株ではIPTG依存性の若干の成育の遅延もみられたが、これがPPKのプロダクトppGppの他にpAppその他の未同定ヌクレオチドを含む細胞内ヌクレオチドプールの変化にどう関連しているのか今後解明せねばならない。細胞内蛋白質のプロフィールには、PPK以外には顕著な変化は見いだされていないがさらに検討中である。さて、ここで観察

された細胞の成育の遅延は預期されたことであるが応用的に面白いと思う。すなわちこのppkを有害菌、病原菌など、例えば軟腐細菌*Erwinia*などに形質転換させて伝達させ、かつ構成的に発現させることができれば、菌遺伝子として利用することも出来るのではなからうか？

我々のもう一つの応用研究を紹介しよう。土壌中の各種窒素固定微生物は環境中の化合態窒素欠乏に際して、前述のごとく緊縮応答的にppGppを合成して窒素固定オペロン*nif*中の制御遺伝子群LAを活性化し、よって全オペロンを開放してニトロゲナーゼを合成し、窒素を固定すると考えられている。N<sub>2</sub>→2NH<sub>3</sub>→……アミノ酸。しかし、この転写は生成アミノ酸→ppGpp→*nif*LAとフィードバック制御され、固定反応における大量の補酵素ATPと還元力の消費を必要最小限度にとどめる仕組みとなっている。そこで我々の緊縮非応答性のppkを窒素固定菌に導入発現させることによって細胞内ppGpp濃度を緊縮制御にいたらない限度内で最適値に維持し、*nif*オペロンを常時活性化し続けることは出来ないであろうか？ 前述のpUC系プラスミドのAmp<sup>r</sup>部位を選択可能なkm<sup>r</sup>に組み換え、さらにppkフラグメントを挿入して単性固定菌*Klebsiella pneumoniae*に形質転換したところ安定に保持され、PPKも発現されることが判った。しかもそれはIPTG誘導性だったので、PPK活性がppkの転写翻訳によって生成したことは明らかである。しかし、数回の実験を繰り返した現時点において、菌のニトロゲナーゼ活性の上昇は確認できなかった。その原因は不明である。他に必要条件があるのかもしれない。さらに検討中である。

ここでは私達がとり組んでいる一放線菌遺伝子の遺伝子農学的応用の可能性について悉意的に述べた。窒素、炭酸固定の増強による化学肥料への依存度の低減と土壤環境改善、温暖化防止、有害微生物の防除等々、21世紀の遺伝子農業に向かって一歩ずつ現実近づけたいと念願している。この研究の中で窒素固定については九州大学農学部土壌微生物学研究室の松口教授の協力を得た。記して謝意を表する。