

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

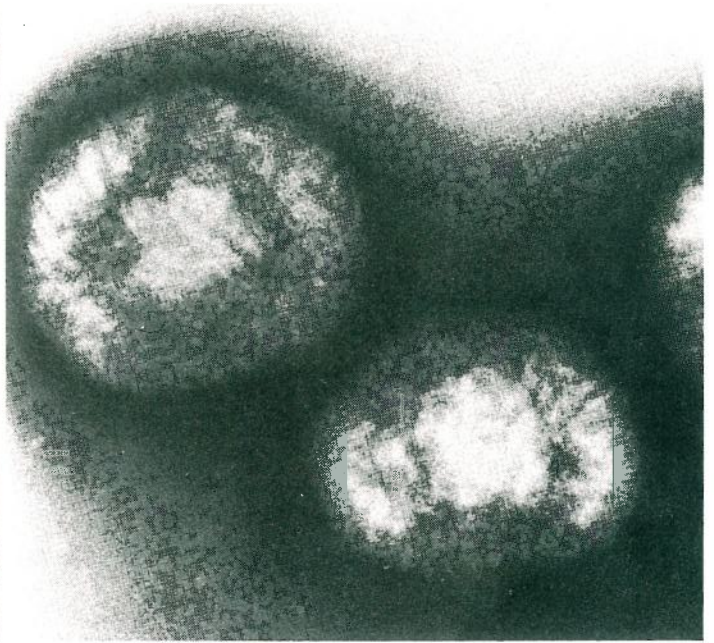
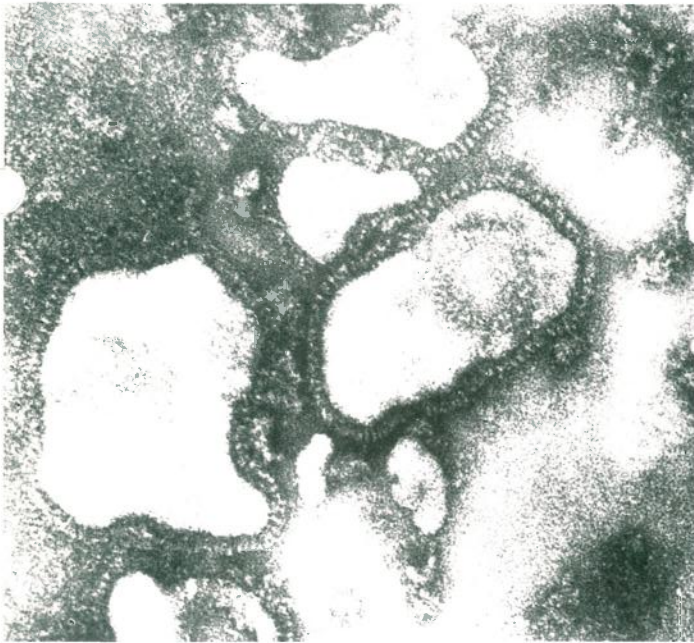
TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

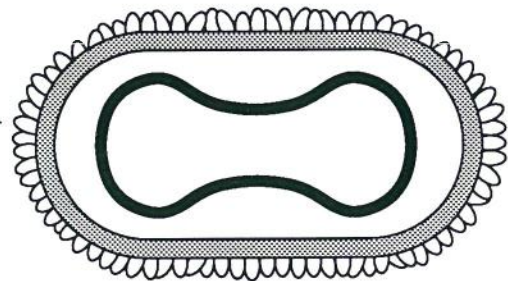
第 26 号

JULY 15, 1991



H gene

Rinderpest



Vaccinia

表紙説明

牛疫 (rinderpest) ウイルスとワクチニア (vaccinia) ウイルスの電子顕微鏡写真およびその模式図

組換え牛疫ワクチンは牛疫ウイルスの構成タンパクのうち、感染防御に働くHタンパクの遺伝子をワクチニアウイルスのゲノムに組込んで作成した。

(本文 3 ページ参照)

本号の紙面

国内情報	1
レーザーによる植物細胞への遺伝子の導入, 組換え牛疫ワクチン, 哺乳動物のチトクローム P-450を導入したショウジョウバエ, 生物窒素固定の酸素耐性化, カイコ培養細胞ゲノムとの遺伝子組換え	
文献情報	16
寄主探索 寄生蜂の植物の匂いの利用, テロメアの構造と機能, 合成オリゴヌクレオチドを利用した治療法, 植物プランクトンと海面温度, サリチル酸と植物の抵抗性誘導	
国際学会レポート	23
第5回国際フリーラジカル研究会総会	
特別情報	25
米国における家畜への遺伝子導入技術	

口 絵

国内情報

金子隆史・伊藤一敏

レーザーによる植物細胞への遺伝子の直接導入……………1

山内一也

組換え牛疫ワクチンの開発……………3

鎌滝哲也・北村龍司・小森雅之・馬場 博・井上裕章・吉川邦衛

哺乳動物のチトクロームP-450を導入した

トランスジェニックショウジョウバエの作出と応用……………7

岩橋 均

生物窒素固定の酸素耐性化……………10

前川秀彰

カイコ培養細胞ゲノムとの遺伝子組換えについて……………13

文献情報

寄主探索寄生蜂の寄主の摂食によって生じた植物の匂いの利用……………16

テロメアの構造と機能……………17

合成オリゴヌクレオチドを利用した治療法……………18

植物プランクトンがアラビア海の表面温度に及ぼす影響……………19

サリチル酸：病原に対する植物の抵抗性誘導シグナル……………20

国際学会レポート

寺尾純二

第5回国際フリーラジカル研究学会(SFRR)総会に参加して……………23

特別情報

Donald C. Beitz (監修：伊地知俊一)

米国における家畜への遺伝子導入技術の開発とその展望……………25

お知らせ

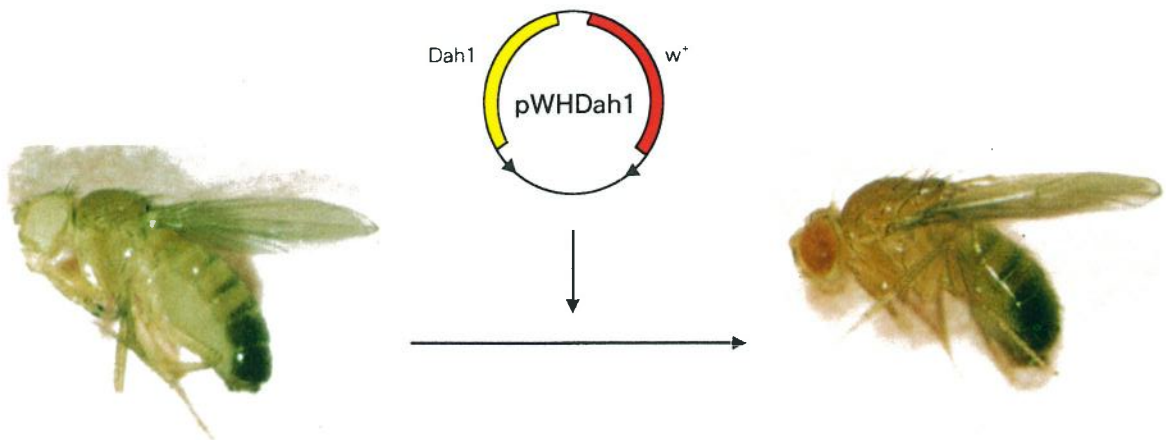
生研機構出版案内……………28

レーザーによる植物細胞への遺伝子の直接導入 (本文 1 ページ)



オオムギ花粉培養細胞をベクターpB1221(GUS遺伝子)溶液中でレーザー穿孔処理後、誘導したカルスに導入形質(GUS酵素活性)がみられた(左)

哺乳動物のチトクロームP-450を導入したトランスジェニックショウジョウバエの作出と応用 (本文 7 ページ)



(左) 白眼系統 w^1 (雄)

本系統の受精卵にイヌのチトクロームP-450遺伝子(Dah1)を挿入したプラスミドpWHDah1を顕微注射した。pWHDah1は、選択マーカーとして赤眼遺伝子(w^+)をもつので、形質転換体は眼色の変化(白→赤)を指標に容易に選択できた。

(右) トランスジェニックハエ (雄)

形質転換体をライン化し、P-450遺伝子の存在とRNAの発現を確認した。同ハエを変異原性試験に供試し、発がん物質である7, 12-ジメチルベンズ[a]アントラセンの代謝的活性化に導入P-450遺伝子が関与することを証明した。

国内情報

レーザーによる植物細胞への遺伝子の直接導入

サッポロビール 植物工学研究所

金子隆史・伊藤一敏

はじめに

形質転換植物の作出は実用形質の導入による新しい育種や、gene taggingなど遺伝解析に必須の技術である。しかし、主要作物の多くを含むイネ科植物では双子葉植物で有効な形質転換法である *A. tumefaciens* の感染という手法を用いることができないため、プロトプラストを介した直接遺伝子導入の方法を模索しているのが現状である。しかし、プロトプラスト培養系の確立は、現在イネ、コムギなど数種の作物に成功例が報告されているが、優良な植物体再分化能力を持つセルラインを作り出すためには多大な細胞選抜を必要とし、そのセルラインも一般的には、長期に安定した再分化能力を維持しないことなど問題も残されている。さらに、品種による培養特性の違いはプロトプラスト培養のような高度な培養技術には重要な要因である。そしてこのことは、特定の品種へ実用形質を付加するための形質転換の利用には不利である。

こういった背景から、プロトプラストを介さないマイクロインジェクション法¹⁾、パーティクルガン法²⁾などの物理的遺伝子導入法が近年、脚光を浴びつつある。これらの方法による細胞内への遺伝子の移入と安定した保持伝達の例証が多く報告され、形質転換植物の作出の可能性は非常に現実性をもってきている。筆者らは効率的かつ簡易な物理的遺伝子導入の手段としてレーザービームによる細胞の穿孔の遺伝子導入への可能性をオオムギ培養細胞で検討した。

レーザー穿孔法の原理

直接遺伝子導入ではその手段に関わらず、細胞内に移入した外来 DNA が染色体へ組込まれることが、後代の細胞および植物への安定した遺伝子の伝達のために必須である。また、この過程は偶然的要素を伴うために、形質転換体の作出のためには多量の細胞に DNA を移入処理する必要がある。プロトプラストのエレクトロポレーション処理ではおよそ $10^{-3} \sim 10^{-5}$ の確率で形質転換細胞が得られる。さらにトランスジェニック植物を作り出すためには、植物体への再分化効率を乗じる必要があるため、一般的には最低 10^4 程度の細胞を処理しなければならないと考えてよいであろう。

レーザー穿孔法による DNA の細胞への移入は動物細胞への選択マーカー *Eco-gpt* の移入で実証され³⁾、その形質転換率は 0.6% と高カルシウム法など化学的移入法の 60 倍の高率であった。植物細胞への適用は Weber らによるナタネの形質転換が報告されている⁴⁾。レーザー法は、他の物理的遺伝子導入法と比べて、1) 直接細胞に触れないことにより短時間に穿孔が行なわれる、2) 顕微鏡下の狙った細胞の希望する位置に穿孔を行なうことができる、3) エネルギー等の調節により細胞へのダメージを抑えることができる等の利点がある。

筆者らが用いたレーザー処理装置（日立レーザー式セルプロセッサ）の原理は簡単であり、指向性の高いレーザービームを顕微鏡光路に導き、レーザーの焦点で穿孔、切断等の細胞の微細加工処理を行なうものである。レーザ

一の焦点は顕微鏡接眼焦点と連動し、レーザーエネルギー強度は、光路途中の減衰フィルターによって調節される。その結果、顕微鏡視野の希望の位置に希望のエネルギーのレーザービームを照射することができる。DNAなど移入したい物質の溶液に細胞を懸濁しておくことにより、穿孔時に、外来物質が細胞内に取込まれるしくみである(図1)。本装置による処理上の最も重要な点は、二次元的に細胞を並べてビームの焦点修正の必要を無くせば、10穿孔/秒で自動的に走査し細胞の高速穿孔処理が可能なことである。この方法で、他の物理的遺伝子導入法で最大の課題である処理効率の低さを解消することができる。すなわち、先にあげた形質転換植物の作出に最低限必要な 10^4 個の細胞を20分程で処理しうる効率であり、トランスジェニック植物の作出を検討するに十分現実的な数字である。

オオムギ培養細胞への適用

我々はイネ科植物のモデル植物としてオオムギを用いてレーザー穿孔による形質転換法を検討した。レーザー法を始めとする物理的手法では処理すべき細胞の表面が見えていなければならない、また多細胞に処理した際の形質転換細胞のキメラ化が避けられない。このため立体的な細胞塊(カルス、植物体組織)は不相当と考え、安定した分裂能力と高い再分化能力を併せもつ単細胞の花粉培養細胞を用いた。実験には β -グルクロニダーゼ遺伝

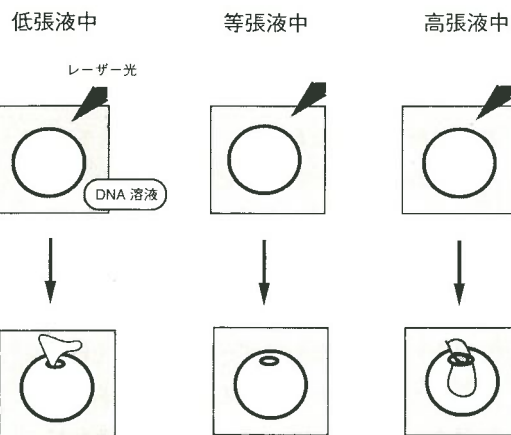


図1 レーザー穿孔によるDNAの取り込み

子とハイグロマイシン耐性遺伝子をマーカー遺伝子とする二つの導入ベクターを用いた。

レーザー処理に際し、遺伝子導入にはレーザーエネルギー強度や溶液の浸透圧が重要な要因であった。すなわち、レーザーエネルギーは穿孔径の大小を左右し、大きすぎると細胞が破裂した。浸透圧は細胞の内圧が変わることにより溶液の細胞内への取込み方に影響した。高エネルギー、低浸透圧ほど細胞へのダメージが大きくなった。細胞への影響は花粉培養細胞のステージによっても異なり、細胞壁(および膜)の穿孔はレーザーエネルギーで $0.4\sim 3.0\mu\text{J}$ の開きがあった。また、分裂直前のサイズの大きな細胞では細胞の内圧が高まっているために、穿孔とともに細胞質の流出が見られた。

処理細胞由来のカルスは二つのマーカー遺伝子の発現を示し(口絵)、PCR法によってDNAレベルでも遺伝子の存在が確認された。他の物理的遺伝子導入法と同様に、同一の処理区でも穿孔しもらす細胞があることや花粉細胞のステージの不均一さから、正確な形質転換率は求めにくい、エレクトロポレーション法と同等の効率で形質発現がみられた⁵⁾。

おわりに

レーザー穿孔による植物細胞への遺伝子導入はナタネに加え、タバコ培養細胞での形質発現⁷⁾の報告があるが、装置の普及の面などからまだ未確立な技術である。今回、初めて外来遺伝子の形質発現と染色体への組込みが、イネ科植物のオオムギ細胞で確認されたことから、本手法はアグロバクテリウム、プロトプラストの系が適用できない作物の分子育種の可能性を広げるものと考えられる。材料によっては、外来遺伝子の細胞の移入と組込みを妨げる細胞壁へのDNAの吸着、内在ヌクレアーゼの影響などの問題が懸念されるが、分裂頻度と再分化能力に優れる細胞系を適用することが実用化の重要な鍵となろう。

文献

- 1) Neuhaus, G. et. al. (1987) *Theor. Appl. Genet.*

75 : 30-36

2) Klein, T.M. et. al. (1987) *Nature* 327 : 70-733) 粕谷敬宏・塚越幹郎 (1987) レーザー研究
15 : 6244) Weber, G. et. al. (1991) *Israel J. Bot.* 40 : 115

5) 金子隆史ら (1991) 育種学雑誌 41別冊 1 : 68

6) 中野隆盛ら (1991) 育種学雑誌 41別冊 1 : 70

7) 内藤博務ら (1990) 育種学雑誌 40別冊 2 : 192

国内情報

組換え牛疫ワクチンの開発

東京大学 医科学研究所

山内一也

牛疫は獣医伝染病のなかでもっとも古い歴史を持つ。リオンに世界で最初の獣医学校が創立されたのは牛疫対策のためであり、国際獣医連合Office international des Epizooties (OIE)が結成されたのも国際間での牛疫の蔓延防止のためであった。我が国の獣医学の出発点でも牛疫対策がきっかけとなった。全世界で牛に多大の被害を与えてきた牛疫は有効なワクチンの普及により、先進国では過去の病気となった。しかし、アフリカ、中近東、南アジアではいまだに発生が続いており、FAOはこれらの地域での牛疫根絶キャンペーンを展開している。

現在、用いられている牛疫ワクチンは非常に高い有効性がある。しかし、牛疫の流行地域はワクチンの保存および運搬のための冷蔵設備、いわゆる cold chain が不十分であるため、現行のワクチンでは十分な効果は期待できない。

この際、参考になるのはWHOによる天然痘根絶である。ここでは高い耐熱性の種痘ワクチンの開発で冷蔵設備のない僻地までくまなくワクチン接種が可能となったのである。

筆者はたまたま30数年前、耐熱性の種痘ワクチンの開発に従事したことがあったが、現在では種痘ワクチンの成分であるワクチニアウイルスをベクターとした組換え牛疫ワクチンの開発を東燃基礎研究所と共同で行っている。もっとも古典的なワクチンから、最先端のワクチン開発まで係ることとなったわけで

ある。現在までの成績を簡単に紹介することとする。

1. ワクチニア・ベクターワクチンの作製

牛疫ウイルスはモービリウイルスに属し、ウイルス粒子表面にHタンパク、Fタンパクの二つのエンベロープタンパク、内部にはNP, M, P, Lの4種のタンパクの計6種のタンパクを有する。このうち二つのエンベロープタンパクが感染防御に役立つ。我々はHとFの両タンパクの遺伝子をまずクローニングし、その遺伝子構造を決定した。

ベクターとしてのワクチニアウイルス株の選定にあたっては人への病原性とワクチン接種対象である牛での増殖性の両面から検討を行った。

本来、牛で種痘ワクチンは作製されていたのである。1頭の牛の腹部で数十万ドーズのワクチンに相当するワクチニアウイルスが増殖する。しかし牛はワクチンの原材料である皮膚の病変組織が採取されたのち、完全に回復する。したがって、牛はワクチニアウイルスに高い感受性を有するが、重篤な病気にはならないといえる。すなわち牛の側ではワクチニアベクター・ワクチンでの副反応の心配はほとんどないと推測される。一方、かりにワクチン接種された牛から人に感染が広がった場合のことを考慮する必要がある。種痘ワクチンは200年近く、全世界の人に接種され

てきた。これだけの実績のあるワクチンはほかにはない。しかし30万人に1人位の頻度で全身性種痘疹、まれには種痘後脳炎のような神経合併症をおこすこともある。この観点からなるべく人に対して弱毒のものが望ましい。幸い我が国には橋爪らにより開発された弱毒のLC16mワクチンがある。これは世界中で唯一の弱毒種痘ワクチンである。そこでこれをベクターとして選んだ。

ワクチニアウイルスは約185kbの大型のDNAウイルスであり、そのうち少なくとも20kbはウイルスの増殖には関与しない。ここに目的の防御遺伝子を組み込むわけである。一般にはチミジンキナーゼ遺伝子部位が用いられるが、我々は志田により開発されたプラスミドを用いてHA部位に挿入することとした。この部位を用いたことは後になって、組換えワクチンの増殖性を高める点で役立っていることが明らかになった。防御遺伝子としては牛痘ウイルスHタンパク遺伝子とFタンパク遺伝子を取りあげた。最終的にはHタンパク遺伝子を挿入した組換えウイルスできわめて良い結果が得られたので、組換えHワクチンにしぼって検討を行ってきている。組換えHワクチンは図1に示すように3種類を作成した。このうち、P7.5kプロモーターを用い、H遺伝子の構造を一部改変したものが次に述べるウサギでの実験でもっとも高い免疫原性を示したので、これを組換え牛痘ワクチンの候補とした。

2. 組換え牛痘ワクチンのウサギでの有効性

我々は日生研中村稔治博士により開発された牛痘ウイルスL株を用いてウサギでの病原性を過去25年間にわたって研究してきた。感染ウサギでは発熱、下痢などの臨床症状、免疫不全、自己抗体の産生といった免疫異常、リンパ組織の壊死病変などがみられる。これらの変化を感染の指標として3種類の組換え牛痘ワクチンの防御効果を比較した。その結果は表1に示したとおりである。

ワクチン接種によりウイルス中和抗体、Hタンパクに対する抗体の産生が確認された。L株による攻撃に対して改変型H遺伝子挿入ワクチンがもっとも高い防御効果を示した。

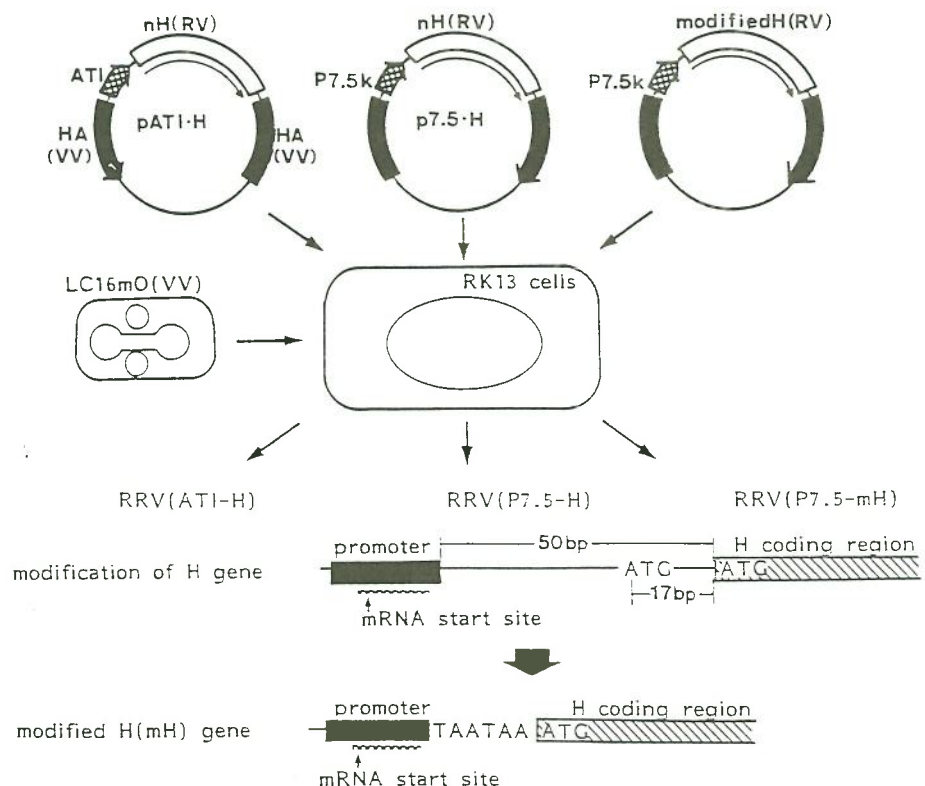


Fig. 1 Construction of recombinant rinderpest vaccine (RRV)

Table 1 Efficacy of recombinant rinderpest vaccine (RRV)

Vaccine	Promoter	Inserted H gene	in vitro expression	Antibody response		Outcome of challenge				PD ₅₀ ***
				VN*	anti-H**	Clinical sign	Immune disturbance	Virus recovery	Lymphoid lesion	
RRV(ATi-H)	ATi	unmodified	+++	++/-	-	-/+	-/+	ND****	ND	ND
RRV(P7.5-H)	P7.5k	unmodified	++	++	++	-	-	ND	ND	10 ^{3.5}
RRV(P7.5-mH)	P7.5k	modified	+++	++	+++	-	-	-	-	<10 ^{2.0}

* VN: virus neutralizing antibody
 ** anti-H antibody estimated by immunoprecipitation
 *** PD₅₀: 50% protective dose
 **** ND: Not done

このワクチン接種によりウサギは上記の指標のいずれの面でも完全に防御された。リンパ組織からの攻撃ウイルスの分離も試みたが、陰性であった。また、100PFU という少量で免疫が賦与されることも明らかとなった。

免疫の持続試験は現在実施中で、すでに2年が経過しているが、いまだに牛痘ウイルスとワクチニアウイルスの両者に対する中和抗体が維持されている。

3. 組換え牛痘ワクチンの牛での免疫原性

我が国には牛痘は存在しないので、強毒牛痘ウイルスによる牛の実験は実施できない。

インドの Indian Veterinary Research Institute と英国の AFRC Institute for Animal Health からの共同実験の申し入れで、牛での免疫原性の検討が進められている。前者は100年前に牛痘研究のために設立されたインド最大の獣医学研究所であり、長い牛痘研究の歴史を有している。後者は牛痘の World Reference Centre である。これまでに得られた中間結果をまとめると以下のとおりである。

1) ワクチン接種された牛では発熱、皮膚病変いずれもみいだされず、副反応はほとんどないものと考えられた。

2) ワクチン接種後、強毒牛痘ウイルスとしてインドの分離株またはアフリカの分離株で攻撃を行った結果、対照牛は発病・死亡したのに対してワクチン接種牛はいずれのウイルスに対しても完全に防御された。

3) ワクチン接種された牛と一緒に置かれた牛は強毒牛痘ウイルスの攻撃で発病・死亡した。すなわち、ワクチンの同居感染は起こ

らなかったことになる。

4) 自然界にはワクチニアウイルスに近縁のポックスウイルスが存在していて、牛がすでに感染していることがある。このような場合にワクチニア・ベクターワクチンが効果を発揮できるかどうか議論となっている。この点を検討するために、あらかじめ、ワクチニアウイルスを接種された牛に組換え牛痘ワクチンを接種し、強毒牛痘ウイルスでの攻撃を行ったところ、この場合にも防御が成立していることがみいだされた。

4. 組換え牛痘ワクチンの安全性

ベクターとして用いたワクチニアウイルス LC16m0 は親株のリスター株よりもサルでの神経病原性ははるかに低いのが特徴であって、これが人での安全性につながっているものとみなされている。

組換え牛痘ワクチンについてマウス、ウサギ、および新世界サルであるリスザルへの脳内接種でこの点を検討した。対照にはもっともよくベクターとして使用されている WR 株を用いた。その結果、WR 株は強い神経病原性を示したのに対して、組換え牛痘ワクチンは LC16m0 株と同様に弱毒であることが確かめられた。

5. 組換え牛痘ワクチンの耐熱性

種痘ワクチンと同様の条件で凍結乾燥したのち、耐熱性を調べたところ、37°C、45°C いずれでも1カ月の保存でほとんど力価の低下がみられず、過酷試験といわれる100°Cの沸騰水中に1時間漬けておいても力価は十分に

保持されていた。これらは種痘ワクチンについての WHO の基準を完全にみたしたものである。

6. 組換え牛疫ワクチンのマーカー

ワクチンマーカーとしては、LC16m0 株の特徴である温度感受性、孵化鶏卵漿尿膜上のポックサイズ、実験動物での低い神経病原性などが利用できる。さらに組換えウイルスの特徴として、HA 領域への防御遺伝子挿入による赤血球凝集性の欠如、制限酵素断片のパターンなどが利用できる。とくに制限酵素断片パターンによりワクチンウイルスの変異を容易に検出しうることは組換えワクチンの大きな利点である。

7. 実用化への過程

組換えワクチンとくにワクチニア・ベクターワクチンは全世界で種々の感染症について現在、もっとも精力的に研究が行われているものである。一方、その実用化は組換えウイルスの野外放出につながるために、環境に対する安全性が問題となる。

ワクチニア・ベクターワクチンのなかでも牛疫ワクチンと狂犬病ワクチンは現在、もっとも開発が進んでいるとみなされている。

牛疫ワクチンについては OIE が WHO, FAO 合同で 1989 年に国際会議を開いて、野外試験までに必要な条件を検討した。

この会議では我々のワクチンのほかに英国と米国のワクチンが候補として紹介された。ベクターの面でほかの二つのワクチンは WR 株を用いていたため、不適當という結論になり、我々のワクチンは妥当と認められた。この会議でまとめられた報告はワクチニア・ベ

クターワクチンの安全性評価に関する唯一の詳細なものであり、牛疫以外にも参考になる内容のものである。

おわりに

近代獣医学の出発点のひとつである牛疫について、我が国では関心を持つ人は少ない。しかし、牛疫常在国では畜産面での最重要課題のひとつとなっている。昨年暮に、Indian Veterinary Research Institute の創立 100 周年記念式典に招かれた際に、来賓として出席されたベンカタラマン大統領がインドには全世界の 7 分の 1 に相当する家畜がいて、その疾病対策は食糧問題の根幹につながると強調された。このような背景があるからこそ、インドは組換え牛疫ワクチンに大きな関心を寄せているのである。牛疫根絶キャンペーンの行われているほかの国々でも同様である。組換え牛疫ワクチンの開発はバイオテクノロジーの成果が開発途上国に貢献するひとつのモデルになりうる可能性を示している。

文 献

- 1) Tsukiyama, K., M. Sugiyama, Y. Yoshikawa and K. Yamanouchi (1987) *Virology*, 160 : 48-54
- 2) Tsukiyama, K., Y. Yoshikawa and K. Yamanouchi (1988) *Virology*, 164 : 523-530
- 3) Tsukiyama, K., Y. Yoshikawa, H. Kamata, K. Imaoka, K. Asano, S. Funahashi, T. Maruyama, H. Shida, M. Sugimoto and K. Yamanouchi (1989) *Arch. Virol.*, 107 : 225-235
- 4) Asano, K., K. Tsukiyama, S. Shibata, K. Yamaguchi, T. Momoki, T. Maruyama, M. Kohara, K. Miki, M. Sugimoto, Y. Yoshikawa, T. Nagata and K. Yamanouchi (1991) *Arch. Virol.* 116 : 81-90

国内情報

哺乳動物のチトクロームP-450を導入した
トランスジェニックショウジョウバエの作出と応用北海道大学 薬学部¹⁾ 三菱化成総合研究所²⁾鎌滝哲也¹⁾・北村龍司¹⁾・小森雅之¹⁾・馬場 博²⁾・井上裕章²⁾・吉川邦衛²⁾

はじめに

ほとんどの変異原物質や癌原物質はチトクロームP-450 (以下P-450) に代表される肝臓の薬物代謝酵素によって活性化されて初めて真の毒性を現す。現在までに我々のグループも含め世界中で多くのP-450分子種が精製・単離され、その毒性学的な機能の解析が精力的に進められている。化学物質の変異原性を検索する手段としては、細菌や培養細胞を用いた *in vitro* 試験法が多用されているが、本来は実際の生体における毒性を探ることが望ましい。その意味で近年ショウジョウバエはその世代時間が短いことから、変異原性の検索の手段として注目されている。しかしながら、変異原物質の活性化機構をショウジョウバエの薬物代謝酵素系に依存するために、哺乳類とくにヒトにおけるリスクを評価するに足る知見を提供することは困難である。すなわち、P-450の分子種は哺乳動物レベルでも種差が存在し、ショウジョウバエと哺乳動物の間ではさらに大きく異なっていることが予想されるためである。そこで筆者らは、最終的にはヒトにおける変異原物質のリスクの予測を行ないうる変異原性試験の樹立を目指して、哺乳動物のP-450を導入したショウジョウバエの開発に着手した。

トランスジェニックショウジョウバエの作出

現在までにP-450の遺伝子はヒトを含めて多数単離されているが、筆者らはショウジョウバエに導入する最初のP-450遺伝子として、ビーグル犬の肝 cDNA ライブラリーより単

離されたDahl^{1,2)}を選択した。その理由としては、当時筆者らのグループで得られていたcDNAクローンの中でも、酵母の発現系による機能の解析が進んでおり、生体レベルでの毒性学的機能に興味を持たれたためである。Dahlを導入するために発現プラスミドの作製手順を図1に示した。必要に応じてDahlの発現を制御できるように、転写のためのプロモーターにはショウジョウバエの熱ショックタンパク質遺伝子を用いた。プロモーターからDahl、ターミネーターまでの領域をさらにトランスポゾンベクター pW8 に挿入してpWHDahlを作製し、白眼系統の受精卵にマイクロインジェクションを行なった。pW8には眼色を赤色にするマーカーが含まれていることから、その後、眼色による選抜で遺伝子導入個体(TD-Dahl)を取得した。そのF1幼虫における導入遺伝子の発現をノーザンブロットで分析した結果が図2である。HS(-)と(+)はそれぞれ熱ショック処理をしない場合とした場合を示している。樹立したTD-Dahlの4系統ともに熱ショック処理した場合のみプローブと反応するバンドが現われた。一方親系統および mei-9,41では熱ショックの有無に関わりなくバンドは検出されなかった。また、サザンブロット分析の結果、導入したプラスミドがショウジョウバエの染色体DNAに挿入されていることが確認され、これらTD-Dahlが安定な遺伝子導入個体であることが確認できた³⁾。

TD-Dahlを用いた変異原性試験

このようにして樹立されたトランスジェニックショウジョウバエを変異原性試験に応用

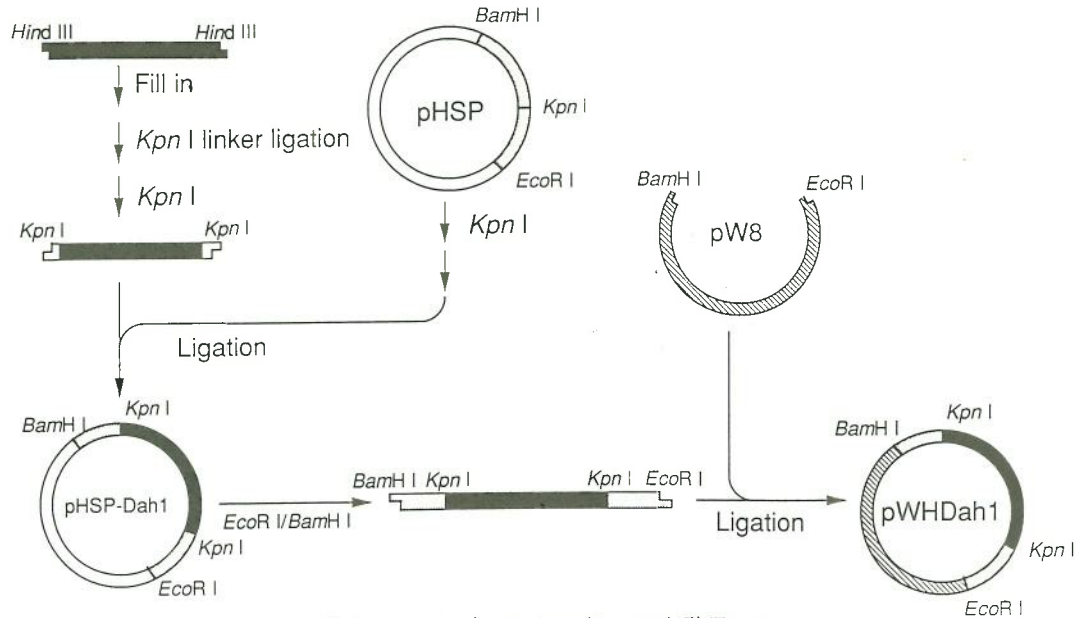


図1 ショウジョウバエでP-450を発見させるための発現プラスミドの作製手順

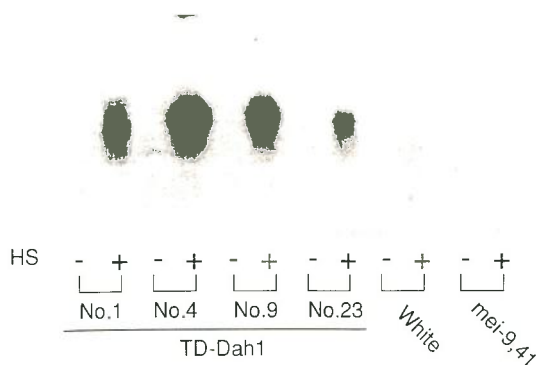


図2 TD-Dah1幼虫RNAのノーザンブロット解析
幼虫の総RNA 20μgを泳動し、ナイロンフィルターに転写後、プローブ (Dah1 全長、1.6kbp) とハイブリダイズした。

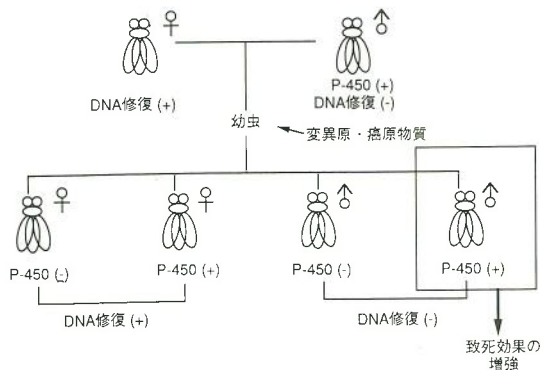


図3 TD-Dah1を用いたDNA修復試験の概要

した。今回我々が用いたのはDNA修復試験と呼ばれる方法である。X染色体上のDNA修復酵素を欠損した雄 (mei-9, 41⁹) と正常雌を交配させると、そのF1には親と同様にDNA修復能を欠損した雄と正常雌がほぼ1:1の比で現われる。F1が幼虫の期間に被験物質を摂食させて、成虫になった雄の雌に対する比を算出すると変異原性の指標とすることができる。

TD-Dah1を用いる場合、親となる雄はDNA修復能が欠損していなければならないため、得られたTD-Dah1をmei-9, 41系統と交配して修復能(-)かつP-450(+)の雄を得た。この雄と正常な修復能を持つ雌をさらに交配させると、図3に示すような4種類のF1が現われることが期待される。すなわち、導入したP-450の発現プラスミドはDNA修復酵素遺伝子と異なり常染色体上に乗っているため、雄と雌のそれぞれ半数ずつがP-450(+)と(-)に分れる。このうち四角で囲んだ雄の個体の変異原物質に対する感受性が増加していれば、P-450を導入したことによる致死効果の増強と考えることができる。

いくつかの変異原・癌原物質を幼虫に摂食させて致死効果を算定したところ、図4に示すように強力な発癌物質である7, 12-ジメチ

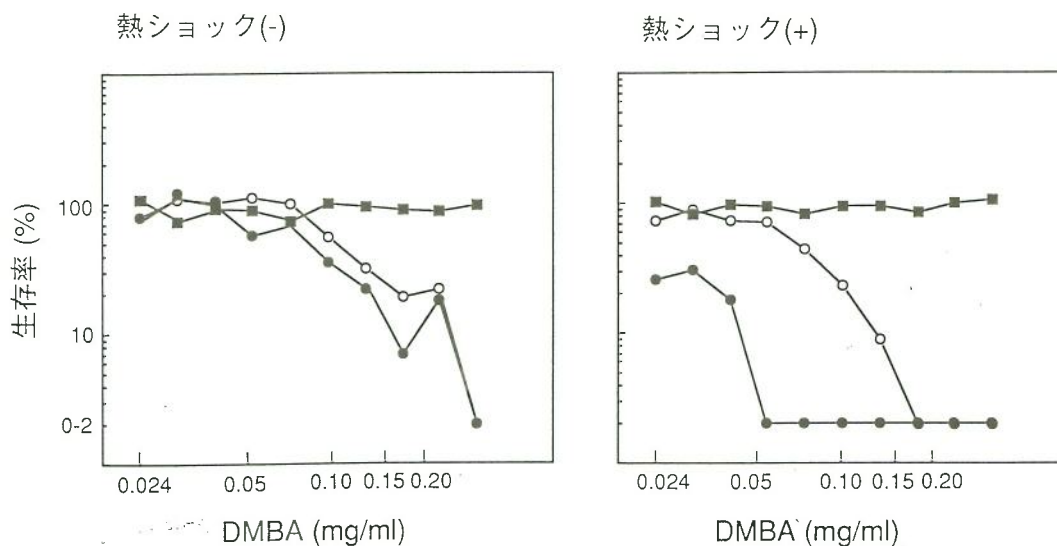


図4 DMBAを幼虫に摂食させた場合のDNA修復試験

雌の生存率(■)、P-450(-)の雄の雌に対する生存率(○)、P-450(+)の雄の雌に対する生存率(●)を表す。右図は熱ショック処理を行なった場合を、左図は非処理の場合を示している。

ルベントラセン(DMBA)の場合で極めて大きな感受性の増強が認められた。すなわち熱ショック処理しない場合(左図)に比べて熱ショックをかけた場合(右図)において、P-450(+)の雄の相対生存率が大きく低下していた。また、致死効果の増強はP-450IAサブファミリーの特異的な阻害剤である α -ナフトフラボンの同時摂取により回復した。これらの事実から、ショウジョウバエ体内で発現した哺乳動物のP-450がDMBAを活性化して致死効果を高めたものと考えられた。DMBAの他にもタバコの煙に含まれるベンツピレンや食品の焼け焦げ中に含まれるTrp-P-2などの変異原・癌原物質についてもTD-Dahlにおいて同様の結果が得られた⁵⁾。

おわりに

本研究により哺乳動物のP-450を導入することで、ショウジョウバエに新たな形質を賦与できることが明らかとなった。よりヒトにおけるリスクの予測を正確化するために、ヒトのP-450の導入も既に始めている。また、

試験法についてもDNA修復試験の他に翅毛スポット試験による突然変異の検索も行なっている。もちろん、癌原・変異原物質の活性化のメカニズムはP-450が単独に司るものではない。今後このような研究を進展させ、かつ他の薬物代謝酵素との関連をも考慮しながらヒトのリスクの予測法を模索して行きたい。

文 献

- 1) Uchida, T., M. Komori, M. Kitada and T. Kamataki (1990) *Mol. Pharmacol.*, 38 : 644-651
- 2) Fukuta, H., T. Uchida, H. Ohi, M. Komori, M. Kitada and T. Kamataki (1990) *Jpn. J. Pharmacol.* 52 : 164
- 3) 福田博子・北村龍司・小森雅之・鎌滝哲也・井上裕章・馬場 博・吉川邦衛(1991) 日本薬学会第111年会講演要旨集 3 : 125
- 4) Baker, B.S., J.B. Boyd, T.T.C. Carpenter, M. M. Green, T.D. Nguyen, P.R. Ripoll and P.D. Smith (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73 : 4140-4144
- 5) 馬場 博・小林真理子・蒲谷京子・井上裕章・吉川邦衛・北村龍司・福田博子・鎌滝哲也(1991) 日本薬学会第111年会講演要旨集 3 : 125

生物窒素固定の酸素耐性化

工業技術院 微生物工業技術研究所

岩橋 均

はじめに

生物窒素固定とは生物が大気中に含まれる分子状窒素を還元してアンモニアを生成する生体反応であり、窒素固定能力を有する生物は根粒菌等一部の原核生物に限られている¹⁾。この反応を触媒する酵素はニトロゲナーゼと呼ばれ、約16個のATPと6個の電子をエネルギー源として1分子の N_2 から2分子の NH_4 を生成する²⁾。アンモニアが植物の3大必須元素のうちの一つであることから生物窒素固定能を間接的あるいは直接的に植物に付与するという事は窒素固定を研究している研究者の大きな夢であり、そのために必要な基礎的なデータが蓄積されつつある。

Klebsiella pneumoniae のニトロゲナーゼが大腸菌で発現できることは1971年 Dixonらによって明らかにされ³⁾、ニトロゲナーゼ(*nif*) 遺伝子群が一つのクラスター内に存在していることが示されている⁴⁾。現在ではこのクラスター内にある20個の遺伝子の一次構造が既に明らかになっている⁵⁾。したがって多大な労力を必要とするが、理論的には植物等の非窒素固定生物にニトロゲナーゼを作らせることが可能な段階にきている。しかしながらニトロゲナーゼは嫌氣的酵素であり酸素によって容易に失活することから、たとえ植物内でニトロゲナーゼを生産できたとしてもニトロゲナーゼの酸素耐性化法を確立しなければその発見は期待できない。種々の窒素固定菌を用いた酸素防御機構の研究は基礎的な研究として欧米等で行なわれているが、ニトロゲナーゼの人工的な酸素耐性化という目的の下に酸素防御機構を構築していこうという

試みは少ない。そこで我々はニトロゲナーゼの酸素耐性化の可能性について、好氣的窒素固定菌 *Azotobacter vinelandii* を用いたニトロゲナーゼの酸素防御機構の解析を行うと共に得られた知見を基に非窒素固定菌である大腸菌を宿主としてニトロゲナーゼの酸素防御機構の構築を試みている。

1. *A. vinelandii* の酸素防御機構の解析

A. vinelandii は好氣的窒素固定菌として広く知られており、ニトロゲナーゼが嫌氣的酵素であるにもかかわらず好氣的に窒素固定が可能であることから、本菌におけるニトロゲナーゼの酸素防御機構は古くから興味もたれている。これまでに、*A. vinelandii* の酸素防御機構として、1) *A. vinelandii* は高い呼吸活性を示すことから呼吸活性によって単に細胞内の酸素を除きニトロゲナーゼを酸素から守るという説⁶⁾、2) 呼吸量を多くしニトロゲナーゼに対するエネルギー供給量を上げることによってニトロゲナーゼ自体が酸素に抵抗性を示すことができるという説⁷⁾、以上の2説が提唱されている。もし1)の説が正しいとすれば *A. vinelandii* で機能している酸素防御機構(細胞内の酸素濃度をゼロとする機能)を非窒素固定生物内で再構成することは不可能に近いが、2)の説が正しいければニトロゲナーゼを他の非窒素固定生物に導入した場合にエネルギー(ATPまたは電子)効率を上げることによってニトロゲナーゼに酸素耐性を付与することが可能であると考えられる。そこで上記の2説についてその正否を確かめるために *A. vinelandii* から酸素感受性株を分離し、その性質を詳しく解析した⁸⁾。分離し

た酸素感受性変異株14株の性質を調べたところ、そのうち数株は高い呼吸活性が維持されており、また窒素源を与えても酸素感受性が回復しなかった。この種の変異株はニトロゲナーゼ活性の酸素による阻害が親株と同程度であった。さらに変異株の1株は無機窒素源を加えない窒素固定条件に比べて無機窒素源を加えた窒素同化条件でより酸素感受性であった⁹⁾。これらの結果は、分離した変異株の酸素による阻害点がニトロゲナーゼ反応以外に存在することを示している。したがって、*A. vinelandii* が窒素固定生育の際に高い呼吸活性を示すにもかかわらず細胞内の酸素が除去できていないということになり1)の説より2)の説の方が有力であると考えた。

2. 大腸菌を用いたニトロゲナーゼの酸素耐性化の可能性

上述のように *A. vinelandii* で得られた結果は、非窒素固定生物にニトロゲナーゼを導入してもエネルギー効率を高めることによりニトロゲナーゼの酸素耐性化を図ることが可能であることを示唆している。そこで、非窒素固定生物である大腸菌をモデル系として、ニトロゲナーゼに対するエネルギーの供給量を増やすことによる人工的なニトロゲナーゼの酸素耐性化について検討を行った。大腸菌内での *nif* 遺伝子群の発現方法はすでに確立されていることから、親株にはW3110由来株で *nif* 遺伝子群をプラスミド pWK220¹⁰⁾ 上に保持している株を用いた。この株は生育限界酸素濃度が0.01から0.03%でありそれ以上では窒素固定生育することができなかった(図1)。ところが、親株の酸素感受性を評価している際に数回植継ぎを行なった培養液のなかに酸素耐性株が蓄積されることを見いだした¹¹⁾。分離した酸素耐性株は生育限界酸素濃度が約0.3%であり、親株に比べ約10倍酸素耐性であった(図1)。さらに *nifKDH* をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果は、この変異株においてニトロゲナーゼ遺伝子群が染色体に組み込まれており、さらにプラスミドを欠落していた。また、酸

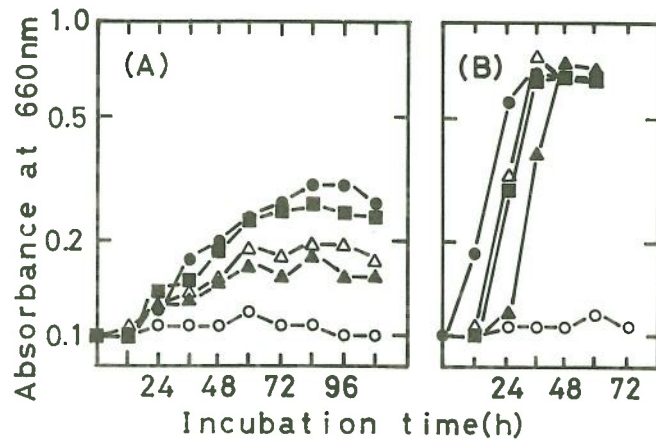


図1 親株と酸素耐性株の酸素耐性(生育)の比較
A: 親株、B: 酸素耐性株
初酸素濃度: 0.01% (●)、0.03% (■)、
0.1% (△)、0.3% (▲)、1.0% (○)

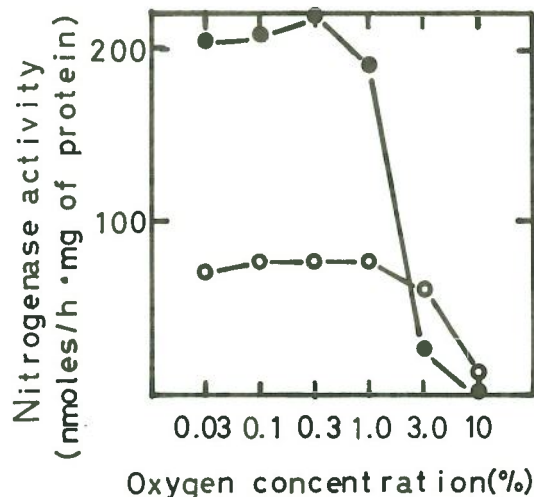


図2 親株と酸素耐性株の酸素耐性(ニトロゲナーゼ)の比較
●: 親株、○: 酸素耐性株

素耐性株のニトロゲナーゼ活性は低酸素下では親株の約3分の1であったが、高酸素下では酸素による酵素活性の阻害が親株で著しくニトロゲナーゼ活性の比は逆転した(図2)。これらの結果から、酸素耐性株はプラスミド上にコードされている *nif* 遺伝子群を染色体に取り込みかつプラスミドを欠落した結果細胞内のニトロゲナーゼ生産量が減少し、1分子当りのニトロゲナーゼに対するエネルギー供給効率が上昇し酸素耐性株となったものと考えた。このことは当初計画していたエネルギー効率を上げることによるニトロゲナーゼの酸素耐性化の可能性を示していると考えている。

3. エネルギー効率の変動と酸素耐性

大腸菌で得られた結果は、1分子当りのニトロゲナーゼに対してエネルギー供給効率を上げることによってニトロゲナーゼの酸素耐性を図れることを示唆している。そこでさらにエネルギー効率の変動がニトロゲナーゼの酸素耐性に与える影響について、以下の4種の方法で検討を行なった¹²⁾。①前培養液に酸素を可能な限り供給することにより大腸菌の酸化能を上げた状態を作る。②アンモニアを前培養液に加えニトロゲナーゼの発現量をおさえる。③ニトロゲナーゼの電子伝達系に関与する *nifJ* または *nifF* 遺伝子を増やして電子伝達の効率を上げる。④調節遺伝子 *nifLA* を導入しニトロゲナーゼの発現量をかえる。①の実験では酸素供給量を上げると、ニトロゲナーゼはより酸素耐性となっていた。②の実験ではアンモニアによりニトロゲナーゼの発現量が抑制されるにつれて発現しているニトロゲナーゼ自身は酸素耐性となっていた。③の実験では *nifJ* と *nifF* を細胞内で大量に発現させると、低酸素下のニトロゲナーゼ活性が *nifJ* で約1.5倍、*nifF* で約4倍に上昇したが逆にニトロゲナーゼ自身の酸素耐性は低下した。④の実験ではニトロゲナーゼの発現量が上昇し、*nifLA* 導入前に比べて酸素感受性となっていた。以上の結果はニトロゲナーゼに対するエネルギー効率の上昇が酸素耐性に必要であることを示す結果 (①②④) であるが、電子伝達の効率を上げるだけではニトロゲナーゼの酸素耐性を構築することはできず (③)、おそらく最終的な ATP の供給量を上げる必要があるものと推論できる。

おわりに

これまでに得られた知見から大腸菌をモデル系とする限りにおいて、ニトロゲナーゼを酸素耐性化できる可能性を示せたものと考え

ている。しかしながら、これまでの知見はあくまでも可能性に過ぎないことからさらに高度な酸素耐性化法の検討が必要である。そのためには ATP の供給量をあげる方法を検討する必要がある。さいわい上述のように前培養の条件を変えることで酸素耐性化をはかれることから、ある種の変異を導入することで ATP の供給量を増やせるものと考え現在検討を行なっている。

日本において生物窒素固定の研究者の数は既に対数増殖期を過ぎ死滅期に入っている。これは生物窒素固定の研究が進み、その複雑さが明らかとなると共に結果の出易い領域が少なくなってきたところにその原因の一つがあるものと考えられる。しかしながら欧米では依然として活発な研究が進められている。国際的な貢献がますます期待される日本の中にあって、生物窒素固定の研究はリスクの多い研究分野であるが故に国立研究機関が積極的にその責任を果して行かなければならないものと考えている。

文 献

- 1) 松口龍彦 (1981) 生物窒素固定の遺伝工学 講談社サイエンティフィック p 1
- 2) 魚住武司 (1988) 生化学 p 1386
- 3) Dixon, R.A. and J.R. Postgate (1972) *Nature* 237: 102
- 4) Dixon, R.A., F.C. Cannon and A. Kondroski (1976) *Nature* 260: 268
- 5) Arnold, W., A. Ramp, W. Klipp, U.B. Priefer and A. Pühler (1988) *J. Mol. Biol.* 203: 715
- 6) 中村道徳 (1980) 生物窒素固定 学会出版センター p 140
- 7) Dingler, C., S. Kuhla, H. Wassink and J. Oelze (1988) *J. Bacteriol.* 170: 2148
- 8) Iwahashi, H., Y. Hachiya, J. Someya (1991) *FEMS Microb. Letters* 77: 73
- 9) submitted
- 10) Klipp, W. and A. Pühler (1986) *Nitrogen Fixation Vol. 4*, Clarendon Press p 95
- 11) Iwahashi, H. and J. Someya (1990) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 168: 288
- 12) in preparation

国内情報

カイコ培養細胞ゲノムとの遺伝子組換えについて

国立予防衛生研究所

前川秀彰

1. はじめに

基礎医学生物学の実験動物として、また有用物質生産動物として遺伝子導入によるトランスジェニック・カイコの作製は重要な意味がある。しかし他のトランスジェニック・アニマルの例が示すように、多くのたゆみない基礎的研究（遺伝学、発生学、生化学、生理学等）の成果があつてはじめて成功するものである。

ところがカイコそのものの研究は、産業用動物という性質上養蚕業の進展とともに発展し、その衰退とともに伸び悩んでいる。また100年もの長い間研究された動物にしては、基礎生物学の論文に顔を出す頻度が以外に少く、またこの分野のカイコ研究者の数が思ったより少ないのは何故だろうか。

いくつもの問題はあると思われるが、そのもっとも大きい原因は養蚕という独特の育種法と、国内外における名目あるいは実質的使用の制約であると考えられる。

これは純系という意味について、いわゆる養蚕学と遺伝学との間に受取り方に差があることから話を進めねばならない。遺伝学では、純系とは特定の形質だけではなく全ての遺伝形質が同一の個体からなる一つの系統を意味する。一組の親から一組の兄弟交配をくり返すことにより得られるものである。しかし、カイコでは通常何組かの雌雄の交配により得られた集団をさらに集団のまま飼育維持していく、いわゆる closed colony なのである。この方法だと産卵数の減少も少なく、糸の質も保てるし、また特定の標識形質については同一になっている。しかし全ての形質が同一

でないため厳密な遺伝学の実験には使えないことがある。

カイコでは例えばリボゾーム RNA 遺伝子のように日常的に使用されるいわゆる house keeping 遺伝子の場合は表現形質もないため、ある系統をとってきても決して同一ではなくいくつものタイプが混合されている。このことは例えば特定の遺伝子の発現を調べようとしたり、トランスジェニック・カイコを作製し、その後代をいろいろ解析、同定する時に個体間の差がもともとの集団内の相違によるのか、遺伝子操作によるのか決めかねる原因を作ることになる。かくして欲張りで勝手なバイオサイエンスの研究者の要望にそうカイコの標準種確立を願うものである²⁾。即ち養蚕用に使用するカイコと基礎研究用のカイコは継代法が異なることを両分野の研究者が明確に認識して研究を進める必要があることを十分に理解していただくことが重要である。

はじめにくどくどと述べた理由は、今まで蓄積された貴重なデータを無駄なく利用していくにはいろんな分野の研究者が相互に、何が問題かを理解しデータを客観的にいろんな角度から見直す努力が今必要とされているからである。それらの力の結集によってしかカイコ研究の発展は望めない状況に至っていると思われる。

以上のことを踏まえたくらうで、今我々が進めようとしているトランスジェニック・カイコ作製へ向けての戦略を述べるとともに、その重要な一步であるカイコ培養細胞のゲノムと導入したプラスミド間の組換え体が得られた経過について述べたい。

2. トランスジェニック・カイコ作製へ
 向けての現段階での方法論⁹⁾ 及び実
 験結果について

まず第一に考えなければならないことは、
 カイコでの現在手持ちの札はどれかというこ
 とである。マウスでの受精卵精核へのマイク
 ロインジェクションによるトランスジェニック
 マウスの作製あるいは、胚幹 (ES) 細胞と
 抗生物質選択等の組合せによるキメラマウス
 作製、また、ショウジョウバエにおけるP因
 子による形質転換の系が確立しているが、残
 念ながらカイコでは類似の系は今のところな
 い。とすれば何が何でもゲノムに入りさえす
 ればそれを突破口にしようという、一見無謀
 な考え方をまず試してみることになる。単純
 に遺伝子導入を組換えの一つの機構としてと
 らえ、それにはコピー数の多い遺伝子で、で
 きるだけ分散しておりその構造もよく解析さ
 れているものがまず有力な候補となる。

それに最も当てはまるものが分散型反復配

列L1ファミリーに属するBMCファミリー
 である⁹⁾。基本単位が約6kbで、ゲノム中に
 3000コピー以上存在し、組換えにより転座し
 ている状況証拠がある。さらにレトロウイル
 スの逆転写酵素に対する相同性が推定され、
 レトロポゾン的一种と考えられているもので
 ある。この中にレポーター遺伝子としてクロ
 ラムフェニコールアセチル化酵素 (CAT) を
 挿入したものを作製した (図1)。今回は特
 に必要ではないが発現を調べる場合にそなえ
 てショウジョウバエ熱ショックタンパク質

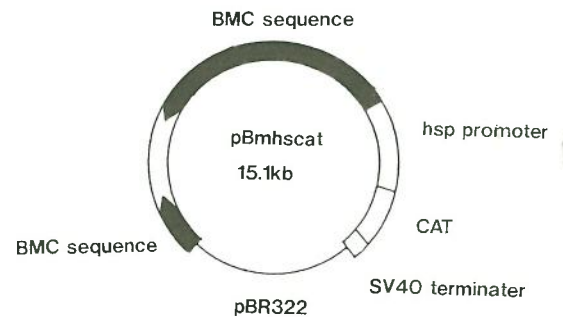


図1 導入用ベクターpBmhscat
 2種のBMC配列の間にレポーター
 遺伝子を挿入してある。

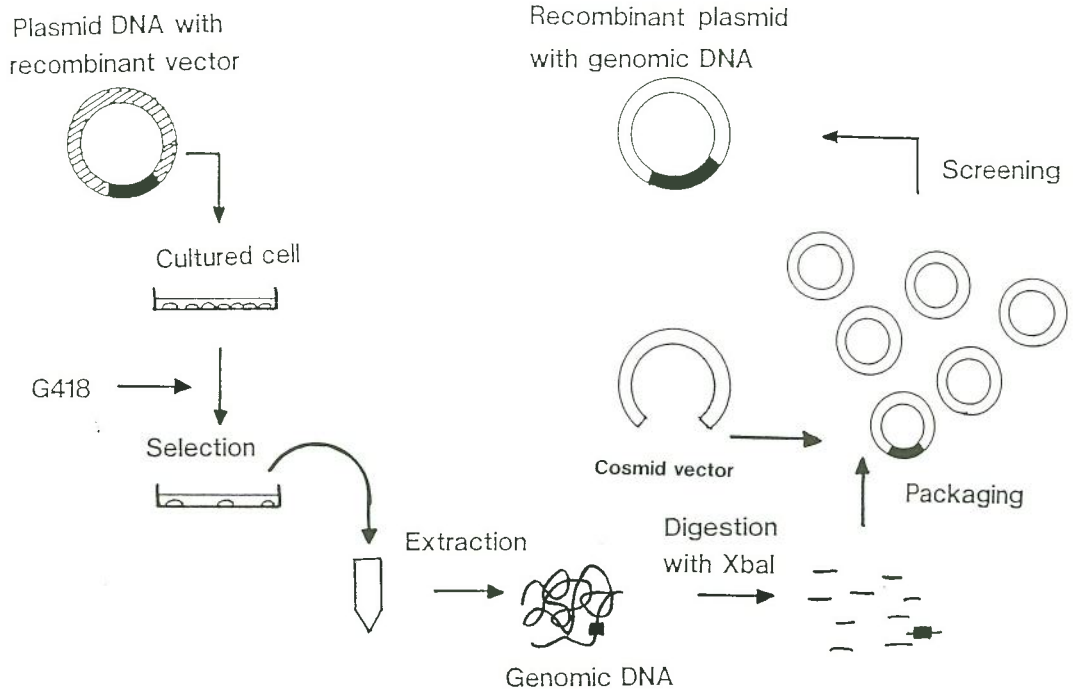


図2 トランスフェクション細胞からの組換えの単離方法
 プラスミド導入後G418の選択をかけ抽出したDNAをXba I
 切断後コスミドに挿入してCATで、スクリーニングした。

hsp70 遺伝子のプロモーターと SV40 の末端付加領域を含むものを構築した^{5,6}。

このプラスミドを図2に従ってまずリン酸カルシウム法で培養細胞 SES-Bm-130T⁷ にトランスフェクションし、ネオマイシンアナログで細胞に毒性のある G418 で選択をかけ、残った細胞から DNA を抽出し制限酵素 *Xba* I で消化後コスミドベクターに挿入しパッケージングの後 CAT をプローブにしてスクリーニングを行った。その結果 4 個のクローンが導入したベクターと異っていることが明らかとなった（未発表のため図示さず）。このうち 1 個についてはゲノム内の BMC 1 ファミリーと組換えを起しており相同組換えの可能性が高い。

もう 1 個は組換えを起した領域内にカイコゲノム特異的ユニーク配列が PCR (ポリメラーゼチェーン反応) 法により増幅され確認された。以上のことからカイコ培養細胞に導入された BMC ファミリーをベクターとしたプラスミドは少なくともゲノムと組換えを起したことは確かである。しかしゲノムに確実に取込まれたかどうかはより大きな領域をスクリーニングするか、パルスフィールド電気泳動法で確認する必要がある。

3. 今後の問題点

組換えが単にコピー数に依存したランダム組換えであるのか、特異的配列が認識されて積極的に組換えられたのかは、次のステップへ進めるに当って重要である。そのためできるだけ正確に組換え効率を算出しなければならないので繰り返しこの実験を行う必要がある。

また、細胞への取込み率はこの系では低いのでいくつかのトランスフェクション法 (リポフェクション法) を試みることも必要である。この場合ウイルスの利用も検討されなければならない。さらに体細胞よりも $10^2 \sim 10^3$ 倍も組換え率の高い精巢も導入対象として有力であると考えられる。とにかくできることから進めていかなければならないが、できるだけ積重ねのできる方向に進めたいし、様々なカイコ研究者のご協力をお願いしたい。

4. おわりに

これらの問題点を解決するうえで常に共同研究者として研究を進めていただいている宮嶋直子、高田直子両技官に感謝するとともに組換え解析に集中している東京大学大学院岡野和広氏に感謝する。また、いろいろご指導をいただいている東京大学農学部小林正彦教授とご校閲をお願いした土田耕三博士にお礼申し上げる。

文 献

- 1) Maekawa H. et al. (1988) *Chromosoma* 96: 263-269
- 2) 小林正彦 (1991) バイオインダストリー 8: 78-83
- 3) 前川秀彰・山内英男 (1991) バイオインダストリー 8: 71-77
- 4) 小椋 光ほか 投稿準備中
- 5) 前川秀彰・岡野和広 (1989) バイオインダストリー 6: 676-683
- 6) 前川秀彰ほか (1989) 組織培養 15: 439-442
- 7) Ninaki, O. et al. (1989) *Invertebrate Cell System Applications*, 1: 143-149

文献情報

寄主探索寄生蜂の寄主の摂食によって生じた植物の匂いの利用

寄生蜂が寄主のいる場所がかいだ匂いを学習して、それをもとに寄主を探索することが近年わかってきた。また植物は、匂いによって他個体に危険を知らせたり、情報伝達をしているらしいと言われ始めている。この論文では、寄生蜂が、寄主によって加害された植物が出す匂いを学習して、寄主探索を行っているという話が報告されている。論文の内容を抄録すると次のようである。

1. 実験に利用された寄生蜂は *Cotesia marginiventris* Cresson (サムライコマユバチの1種) その寄主は *Spodoptera exigua* Hübner (シロイチモジヨトウ), その寄主が食べる植物はトウモロコシである。

2. ガラスで密閉された容器に、シロイチモジヨトウに加害されたトウモロコシとシロイチモジヨトウをいれ、そこで発せられた揮発性物質(匂い物質)を吸着剤(Super Q adsorbent)で集め、吸着剤に捕まった揮発性物質をガスクロマトグラフィー(Quadrex methyl silicone column)で分析した。その結果、常に11種の成分が分離された。流出の早い順に、初めの4成分は、植物葉に普通に検出される青葉アルデヒド、青葉アルコール、アセテートの類であった。残りの成分は、インドール以外は全てテルペノイドであった。この同定された化合物は全て(ヨトウに加害された)植物体から発せられるもので、ヨトウ自体もしくはヨトウが出す副産物(糞など)から発せられるものではなかった。

3. 11種の成分のうち分子量の大きい方のテルペノイドは、数時間ヨトウの加害を受けた植物から発せられ、2時間ヨトウに加害させた後すぐに測定すると、ごくわずかししか検出されなかった。実験に使う加害を受けた植物は、数時間以上ヨトウに加害させる必要があることなどがわかった。

4. ヨトウによる加害を受けた植物の発する揮発性成分パターンは、ヨトウ加害植物に特異的で、人工的に植物を傷つけただけでは、各揮発性成分はごくわずかししか検出されなかった。①トウモロコシをヨトウを使って加害させた場合と、②カミソリで人為的に傷つけた場合と、③カミソリで人為的に傷つけたらうに、ヨトウの胃内容物を吐き戻させてその傷に塗布した場合と、④植物は傷つけずに、胃内容物塗布だけを行った場合で、植物の発する11種の揮発性成分パターンを比較した。その結果、②は①と比べて、テルペノイド成分の量のはるかに少なかった。しかし、②にヨトウの胃内容物塗布という処理を施した③は、テルペノイド成分の量、パターンが①と同様であった。④はテルペノイドがほとんど検出されなかった。すなわちヨトウ加害植物と同様の揮発性成分パターンを得るためには、人為的な損傷とヨトウ胃内容物塗布が必要であった。

5. 前述の①~④の場合の植物のうちから二つずつ選び、二つのうちどちらを、ヨトウ加害植物の上に寄主のヨトウがいることを経験した寄生蜂は選択するか、フライトトンネルを使って実験した。②と①では、①を選択するものが多く、②と③では、③を選択するものが多かった。しかし、①と③では有意な差は得られず、②と④では、②を選択するものが多かった。寄生蜂は、ヨトウに加害されたトウモロコシが出し加害されていない植物は出さない匂いと、寄主ヨトウの存在を結び付けて学習し、その匂いを手がかりに寄主探索を行っていることがわかった。

天敵を害虫防除に利用する際、天敵がどうやって害虫を見つけるか知ることが重要である。天敵の害虫発見の効率を高めることができれば天敵利用の害虫防除はより効果的になるであろう。この研究にはそういった実用面での背景もある。

(抄訳 窪田敬士—農環研)

Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps
Turlings, T.C.J., J.H. Tumlinson and

W.J. Lewis

Science, 250: 1251-1253 (1990)

文献情報

テロメアの構造と機能

初期の細胞学的・遺伝学的研究から末端が欠失した染色体は不安定であることが明らかになり、染色体の末端には染色体の安定化に寄与している特殊な構造—テロメア—が存在することが推測された。さらに分子遺伝学により DNA が半保存的に複製することが証明されてからは、真核生物の染色体 DNA のような線型 DNA の複製を半保存的複製モデルでのみ証明しようとする lagging 鎖の 5' 末端が複製のたびに RNA primer の分だけ短くなることになり、それを補償するような機構が染色体の末端に存在することが示唆されてきた。

ここでは真核生物の染色体末端に特徴的に見られるこのテロメアの構造と機能について Blackburn 女史（テロメアを特異的に複製する telomerase の存在を初めて証明した）が最近の研究の成果をまとめた総説を紹介する。

Telomeric DNA organization

テロメアを構成する DNA の塩基配列は真核生物の間で共通した特徴を持っており、G と T を主に含む単純な配列（例、AGGGTT: ヒト GGGGTT: テトラヒメナ）がタンデムに、例えばヒトでは数 kbp、テトラヒメナでは数百 bp に亘って繰り返している。そして末端部分では 3' 末端が 12-16ヌクレオチド分、相補鎖を持たず突出している。

Telomerase

テロメアの G-rich 鎖 (leading 鎖) は DNA polymerase ではなく、telomerase によって伸長する。telomerase 活性はテトラヒメナなどの繊毛虫類やヒト培養細胞 (HeLa) などで検出されている。テトラヒメナの telomerase を解析した結果、この酵素は RNA とタ

ンパク質とからなっており、RNA 配列中にテトラヒメナのテロメアの繰返し単位と相補的な配列が見出された。そして組換え DNA 実験により、この RNA 配列がテロメアの G-rich 鎖合成のための鋳型になっていることが証明された。したがって telomerase は鋳型としての RNA を自分自身で持っている例外的な逆転写酵素とすることができる。

テトラヒメナでは細胞が継代して長期間生存していくうえで telomerase 活性が必須であることが示された。また、酵母では *EST1* 遺伝子に変異がおこると代を重ねるうちにテロメアが短くなりついには死滅することが知られているが、最近この遺伝子は telomerase のタンパク質部分をコードしていることが確かめられた。このように少なくとも単細胞真核生物においては telomerase がテロメアの長さの維持に必須であり、ひいては継代して長期間生存してゆくためにも必須であることが証明された。逆転写酵素が真核生物の DNA 複製に関与していることを示した最初の例である。

Telomeric protein

telomerase 以外にテロメアと特異的に相互作用するタンパク質として telomere structural protein が見出された。このタンパク質はテロメアの 3' 突出末端に特異的にかつ強固に結合しており生体内で telomeric end を保護するキャップのような役割を果たしていると思われる。また、テトラヒメナではテロメアの間部分に突然変異がおこっても生存にさしつかえないが突出末端部分に変異をおこすと核分裂が正常にいかなくなることから、このタンパク質はもっと積極的に染色体の telomere 部分と核膜との結合に関与して、染色体の正常な分離にかかわっていると推測される。

Telomeric DNA structure

テロメア DNA はその例外的な塩基配列から、特殊な構造をとっていることが十分予想される。テロメアの繰返し配列を持ったオリゴヌクレオチドを用いて調べると、非 Watson-Crick 型の G-G 塩基対によって、おりたたみ構造 (foldback) や 4 本鎖構造 (quadruple

helix)を取りうることを示されているが、実際にテロメア末端が生体内でどのような構造をとっているかは不明である。

Telomere length and loss

テロメアをのばすメカニズムがなければ染色体DNAは半保存的複製を繰り返すたびに末端から徐々に短くなってゆくはずである。ヒトの場合、生殖細胞の染色体は約10kbpのtelomeric repeatを持っているが、このテロメアの平均長は加齢が進んだり培養細胞の分裂回数が多なるにつれ、しだいに短くなる傾向にある(30~50bp/分裂)。このことは哺乳動物の正常な体細胞ではtelomerase活性がないか、あっても非常に低いためと考えられている。そこで脊椎動物ではテロメアDNAが複製のたびにしだいに短くなることにより染色体が不安定になり、それが老化につながるという考えが提出された。最近マウスでこのような単純な相関は認められなかったという例が報告されたが、老化のメカニズムに関するこのような単純な仮説は興味深い。

最後に著者はtelomeraseをターゲットにした、病原性原生動物特異的な薬剤の可能性について言及しているが、ガン細胞で高いtelomerase活性が検出されていることを考えれば制癌剤の有望なターゲットとしても期待される。このようにテロメアというこれまでどちらかといえば付属品の存在だったものがtelomeraseという新しい酵素の発見により癌化と老化という現代医学の2大トピックスに深くかかわっていることが明らかになってきた。今後の研究の進展が期待される。

(抄訳 高野 誠—生物研)

Structure and function of telomeres

Blackburn, E.H.

Nature 350 : 569, 18 April, 1991

文献情報

合成オリゴヌクレオチドを利用した治療法

オリゴヌクレオチドを治療薬として使う可能性について以下に議論する。近年のオリゴヌクレオチド合成技術の進歩によって、オリゴヌクレオチド・ドラッグ開発のための研究が盛んになった。現在可能と考えられているものは三つのクラスに分類される。そのうち二つはアンチセンスおよびトリプルヘリックス形成を利用するもので、遺伝暗号の発現を妨害することからコード・ブロッカーと呼ばれる。もう一つは、オリゴヌクレオチドをランダムに合成した混合物からターゲットとなる生体分子に強く結合するものを拾ってくるもので、アプタマーと呼ばれる。

アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、ターゲットとなるRNAに相補的な配列を持たせたもので、ハイブリディゼーションによって結合することによりそのRNAがさらにプロセッシングを受けたりタンパク質に翻訳されるのを防ぐので、病気に関わるタンパク質の合成をブロックできると考えられる。細胞のタンパク質合成を抑制することは既に証明されている。長さは15から18ヌクレオチド必要であり、分子量は5000程度となる。医薬品としての性質を改良するための修飾がいろいろと試みられている。たとえば、3'末端の誘導体とすることによって血液中におけるエクソヌクレアーゼに対する安定性を大幅に高めたり、リン酸基をホルムアセタール基で置換することによってヌクレアーゼに対する抵抗性を持たせたという報告がある。後者の修飾は荷電を取り去って中性にするため細胞内への透過性も増しそうである。しかし、効率良く透過させるということが依然としてオリゴヌクレオチド・ドラッグ開発における最大の課題となっている。自由に細胞を透過できれば服用量が少なくてすみアンチセンス療法も経済的に可能となるであろう。

トリプルヘリックスを形成するオリゴヌクレオチドは、DNAの2重らせん構造の大きい方の溝に位置する特定の配列に結合して3重らせんを形成し、DNAの複製や転写を阻害すると期待される。制限酵素消化や転写因子の結合を部位特異的に阻害することは既に示されている²⁾。DNAをターゲットとするためアンチセンス法よりずっと服用量が少なく済み、また長持ちする。というのは、1個の細胞中にはmRNAが1000コピー位も存在し絶えず合成されているのに対して、対応するDNAの方は数コピー程度であり合成速度もRNAよりずっと遅いからである。この方法のもう一つの利点は、アルキル化グループを導入しておくことトリプルヘリックス形成後アルキル化が起こり、その遺伝子を不可逆的に修飾できることである。たとえば、細胞が癌やウイルスに侵されてしまってもそれらの遺伝子を永久的に不活性化できるであろう。一方、問題点は、現在まで研究されてきたものではアデニンとグアニンだけからなる配列しか認識できないため、ターゲットが限られてくることである。この問題を克服するために、“switchback” linker というものが分子モデリングによって考案された。これを使えばオリゴヌクレオチドをそれを境に別々のストランドと結合させることができ、多くの配列をターゲットにできるであろう。

アプタマーは、フィルター・バインディングやアフィニティ・クロマトグラフィーを利用して 10^{13} もの異なる配列を持つオリゴヌクレオチドのランダムプールの中から色素やタンパク質などのターゲット分子と強く結合するものを探し出すという形で発見された^{3,4)}。この場合、結合に最適な立体構造を持った分子が選別されると考えられる。この方法によれば、治療に利用できそうな細胞表面のレセプター分子をターゲットにすることによって強力なインヒビターをつくり出すこともできるであろう。そうすれば細胞透過の問題も回避できる。また、ランダムプールの中からの選別において、結合親和性ばかりでなく治療薬として重要な性質を持たせることもできよう。

このように、オリゴヌクレオチドは種々の幅広い生物活性を有し、これを人の病気の治療に応用するための化学的、生物学的方法が既に確立されていることは幸運なことである。

- 1) Izant, J.G. and H. Weintraub (1984) *Cell* 36 : 1007-1015
- 2) Maher, L.J. et al. (1989) *Science* 245 : 725-730
- 3) Ellington, A.D. and J.W. Szostak (1990) *Nature* 346 : 818-822
- 4) Blackwell, T.K. and H. Weintraub (1990) *Science* 250 : 1104-1110

(抄訳 高瀬研二——生物研)

Oligonucleotide-based therapeutics

Riordan, M.L. and J.C. Martin

Nature 350 : 442, 4 April, 1991

文献情報

植物プランクトンがアラビア海の表面温度に及ぼす影響

海面の近くの混合層（表層）の温度分布は混合層と大気の様々な条件に左右されている。中でも、海面に入射した可視光の減衰は海水の温度に大きな影響を与えており、植物プランクトンに含まれるクロロフィルが特に重要な役割を果たしている。地域や季節によって海水中のクロロフィルの濃度が大きく異なるにもかかわらず、海水の温度変化の推定にあたって、植物プランクトンの役割を考慮したものは少ない。以前は、クロロフィルの地域分布についてのデータがなかったことがこのことの原因の一つである。しかし、最近ではリモートセンシングによってクロロフィル濃度の地域分布が明らかになってきている。

本論文では、アラビア海の混合層における温度分布について述べる。著者らは、よく知られている Kraus-Turner モデルを応用して、アラビア海の北緯10度付近の地域にあてはめ、1979年の各月の平均値を計算した。計算にあたっては、短波長の光の50%は海面の表面近くの1 m以内のところで吸収される

と仮定した。混合層における減衰率 (ν) は $\nu = (-\log F)/h$ で定義される。ここで、 h はその月の初めの表層の厚さ、 F は混合層で吸収される光の割合を示している。 h のようなパラメータの値は観測値に対して気候学的な考察を加えた平均を行って計算した。表面温度 (T_s) や混合層の底の部分の鉛直方向の水温の変化率は既知であることを仮定した。また、海面での運動量と熱の流量の月平均値も既知であるとした。このモデルを使って1か月間の積分をおこない、1か月後の海面の温度と混合層の厚さを計算した。

その結果、植物プランクトンの地域分布は、1月(モンスーンが北にある)と9月(モンスーンが南にある)では大きく異なることがわかった。これは、海水の上昇流が強くなることによって養分の供給が増加した地域では混合層の中の植物プランクトンが増加するためである。次に、毎月のバイオマス量から計算した表面温度と、植物プランクトンの量は ν に影響を与えないことを仮定したときの表面温度との差 (ΔT_s) を計算した。各々の月の初めでは、 $\Delta T_s = 0$ としているので、この ΔT_s は混合層の植物プランクトンが混合層の温度に及ぼす影響を表していると考えられる。この計算の結果、 ΔT_s は海岸の近くで最高の値を示したが、海岸の近くでないところでも高い値を示している地域があった。3月から4月にかけては、 ΔT_s の最高値は東側の地域に表れたが、10月の最高値は西側の地域に表れた。また、バイオマス量と ν の値との関数関係は線形ではないことがわかった。したがって、混合層の温度とバイオマス量の関係を知るためには、バイオマス量の平均値だけではなく、その時間的な変動も重要である。さらに、混合層の温度を計算するにあたっては、 ν の値が最も重要なので、混合層での乱流についての計算方法を変えても、結果は変わらないことも明らかになった。

一般に、海水の表面温度の変動は、同じような時間・空間スケールの大気の状態の変動をもたらすだろう。例えば、ある地域の表面温度が上昇すると海面からの蒸散、顕熱・潜熱伝達、長波放射が増加する。著者らの計算

では、 ν の最大値は8月から9月にかけて得られた $4^\circ\text{C}/\text{月}$ であった。これは海水と大気との間の熱の流れに大きな影響を与えると思われる。鉛直方向の海水の流れによる冷却の効果の最大値が $2.5^\circ\text{C}/\text{月}$ であることを考えると、このことの意味がより明らかになるだろう。

混合層の温度に対して植物プランクトンは主に二つの作用を持つ。一つは、海水の温度が下がる季節の保温であり、もう一つは海水の温度が上がる季節の吸熱である。そして、混合層が吸収した熱エネルギーの一部は大気に放出されるので、植物プランクトンは混合層と大気の両方の温度を安定化している。しかし、植物プランクトンによって混合層と深層との間の温度差は拡大している。この温度差は鉛直方向の海水の攪はんとは密接に関連している。特に、子午線の近くの鉛直方向の海水の攪はんは、広域にわたる南北の熱伝達の主な原動力とされているので、混合層の植物プランクトンは海洋における地球規模の熱伝達とも深く関わっているかも知れない。

(抄訳：竹澤邦夫——農環研)

Biological control of surface temperature in the Arabian Sea

Sathyendranath, S., A.D. Gouvenia, S.T. Shetye, P. Ravindran and T. Platt
Nature 349: 54, 3 Jan. 1991

文献情報

サリチル酸：病原に対する植物の抵抗性誘導シグナル

生物は外界からの信号を認識し反応するべく複雑な生化学反応系を進化させてきた。これらの反応系には、受容体・ホルモン・二次メッセンジャー・酵素による修飾などが関与している。これまで病原による攻撃に対する植物の反応により活性化される信号伝達反応系についてはほとんどわかっていないが、この

問題は病気に対する感受性と抵抗性について理解するうえで中心的テーマである。植物の抵抗性は一般に病原の増殖が感染部位を中心とした狭い範囲に限られる現象である。多くの場合、この局在性は宿主植物の局部壊死をとまなう。同時に、病原の局在と局部壊死は過敏反応 (hypersensitive response, HR) の特徴でもある。このような局所的な防御反応に加えて、多くの植物では感染を受けていない組織の防御を活性化させ反応する。結果的に植物体は二次感染に対してより抵抗性となる。この全身的な獲得抵抗性 (systemic acquired resistance, SAR) は数週間かそれ以上持続し、しばしば異種の病原に対して交差抵抗性を示す。Malamy らは植物の病気と抵抗性を調べるモデルとして、タバコ (*Nicotiana tabacum*) と TMV (タバコモザイクウイルス) を用いた。一般に、タバコは TMV の感染に対して二通りの反応を示す。ひとつは優性の N 因子をもつタバコ品種で、HR および SAR の両方の反応を示す。一方、この N 因子を欠く品種 (nn 遺伝子型) は TMV 感受性である。ウイルスは増殖し速やかに植物体全体に移行し、萎縮や黄斑モザイクを上葉に生ずる。NN 遺伝子型の品種では TMV の感染に反応して特異的にいくつかのタンパク質を新たに産生する。これらのタンパク質は病原性関連タンパク質 (pathogenesis-related (PR) proteins) と呼ばれ、五つの異なったタンパク種 (PR1~PR5) に分類される。PR タンパク質は多くの植物で見い出されており、様々な病原ウイルス・ウイロイド・糸状菌・細菌およびある種の外因性のあるいは化学的ストレスによっていくつかの異なったタンパク種が誘導される。これらの PR タンパク質のうちあるものは防御に関連して酵素的な活性を示し、また PR 遺伝子の発現と抵抗性との間の相関関係などから、これらのタンパク質は SAR や HR に関与しているものと考えられている。しかしながら最近、PR 遺伝子を導入し発現するタバコが抵抗性を示さなかったことが報告され、複数の要因が抵抗性に関与しているものと考えられるようになった。サリチル酸あるいはその誘導体のアセチルサ

リチル酸を用いると、タバコを含む多くの植物で特異的に PR 遺伝子を発現することは知られていた。またサリチル酸を TMV や他のウイルスおよび糸状菌に感染した部位に用いると抵抗性を増加させることも知られていた。Malamy らは植物体で産生されるサリチル酸が PR 遺伝子の活性化に関与しているかどうかを近縁のタバコ品種キササンチ (Xanthi) (nn) (すでに述べたように TMV 感受性である) とキササンチ nc(NN) (*N. glutinosa* からの N 遺伝子をキササンチ (nn) に交雑したもの) (TMV 抵抗性) を用いて調べた。両タバコに TMV を接種し、サリチル酸産生量と PR1 遺伝子の発現レベルをモニターした。その結果、TMV を接種したキササンチ nc(NN) の感染葉では、TMV 接種後 0~18 時間後には低いながらもサリチル酸が検出され、42~48 時間後には 20 倍以上のレベルに達し、その後も増加を続けた。また非感染葉では、72 時間後に最高レベルに達した。一方、PR1 遺伝子の発現もそれに併行して増加した。特に非感染葉では、サリチル酸の増加に少し (約 24 時間) 遅れるように、72 時間後に初めて検出され、その後増加した。しかし、キササンチ (nn) の疑似接種区および TMV 接種区とキササンチ nc(NN) の疑似接種区では、サリチル酸産生量も PR1 遺伝子の発現レベルもほぼ皆無であった。また TMV に感染したキササンチ nc(NN) のサリチル酸産生は、ウイルス感染に伴う負傷に対する組織の反応ではないことが確認されたことから、サリチル酸は局部的および全身的な植物の防御に関与していると考えられる。1983 年、Van Loon は PR 遺伝子の発現や病気に対する抵抗性の引金となるフェノールシグナルが植物体内でつくられるのに呼応してサリチル酸が産生されると主張したが、以上の結果からそのシグナルが実はサリチル酸そのものであったことになる。したがって、感受性の植物はサリチル酸産生や抵抗性、PR 遺伝子の発現を誘起するシグナル伝達系を感染によって活性化することが出来ないことになる。Métraux らも同時に同様な結果を報告している。彼らは、キュウリにタバコネクロシスウイルス (tobacco necrosis virus,

TNV) または炭そ病の病原糸状菌 *Colletotrichum lagenarium* を接種し、そのし管液を採取し分析した。その結果、いずれの接種でもサリチル酸が接種2日後には急増したが、対照の無接触区ではほとんど検出されなかった。また、それらの上葉に日を追って炭そ病菌を2次接種したところ、サリチル酸の急増した日以降抵抗性が急上昇した。キュウリの場合、サリチル酸の増加に伴って産生するPRタンパク質はエンドキチナーゼである。Raskinらは最近、ある種の発熱性のユリ類の花における熱や香りの発生のレギュレーターとしてサリチル酸が働いていることを報告した。これらのことは、サリチル酸が植物体におけるシグナル伝達に広くかつ重要な役割

を果たしていることを示唆するものである。

(抄訳 難波成任——東大農)

Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection

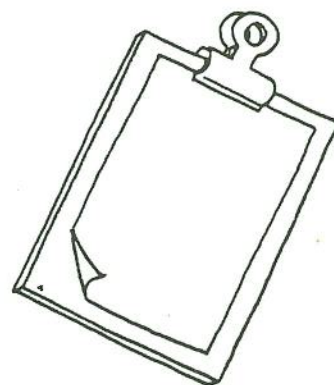
Malamy, J., J.P. Carr, D.F. Klessig and I. Raskin

Science 250 : 1002-1004 (1990)

Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber

Métraux, J.P., H. Signer, I. Ryals, E. Ward, M. Wyss-Benz, I. Gaudin, K. Raschdorf, E. Schmid, W. Blum and B. Inverardi

Science 250 : 1004-1006 (1990)



国際学会レポート

第5回国際フリーラジカル研究学会
(S F R R) 総会に参加して

農水省 食品総合研究所 脂質研究室

寺尾純二

フリーラジカルや活性酸素という用語も次第に一般的な言葉として用いられつつある。これは、生体内で発生するフリーラジカル・活性酸素による生体障害やフリーラジカルを利用した生体防御系が各種疾病をはじめ、発ガンや老化などの発生や予防治療と深く関わっていることがようやく認められてきたことによるものである。標記学会(International Society for Free Radical Research, 5th Biennial Meeting)は、生体内でのラジカル発生や疾患の発現など医学、生化学、化学などの分野にまたがる学際的な問題に対して、広い角度からフリーラジカル研究を進めることを目的として1981年に発足した世界的規模の学会である。したがって、隔年次開催される総会では世界の4支部(欧州、オーストラリア、日本、米国)からフリーラジカル研究に携わる医学者、化学者、生化学者、栄養学者などが集まり、それぞれ異なる専門分野から研究発表を行い、たがいに情報交換を行うというユニークさが特徴となっている。

昨年11月14日から19日まで米国カリフォルニア州ロスアンゼルス郊外のパサディナ市(ローズボウルの開催地として名高い)において開催された第5回総会に参加する機会を得た。今回は南カリフォルニア大学の K.J. Davis 教授が会頭となり“Oxidative Damage and Repair”をメインテーマとして20のセッションに分けられて講演や発表が行われた。毎日午前中は四つのセッションについて全員が参加するレビュー講演がもたれ、午後は四つの会場に分かれて、各セッションのテーマ毎に6題の招待講演ないし口頭講演が行われた。その他はすべてポスター発表であり、ポ

スターは朝から夕方まで掲示され、昼食後と夕方に一時間ずつ2回の討論時間をもたれた。各セッションは活性酸素・フリーラジカルに関連するほとんどの分野を網羅しているため、個々の内容をここで詳しく説明することはできない。ここでは、総演題集687題のセッション別分布から本学会での研究発表の動向を紹介したい。

第5回国際フリーラジカル研究学会総会におけるセッション別発表登録演題数

酸化ストレス遺伝子およびタンパク	27
抗酸化物質	65
フリーラジカルの細胞内発生	32
ESR-スピントラップ法と新手法	34
DNA 障害とその修復	41
フリーラジカルの化学と放射線化学	26
動脈硬化ーリポタンパクの酸化的修飾ー	37
光酸化ストレスと光動力学治療	26
タンパクの障害とその修復	34
虚血再還流障害のメカニズム	44
酸化ストレスにおける代謝制御	38
スモッグ	14
脂質の障害とその修復	36
抗酸化酵素	42
炎症	44
抗酸化剤治療ー虚血再還流火傷外傷	34
チトクローム P 450と酸化ストレス	17
癌と酸化ストレス	38
酸化ストレスと遷移金属	37
抗酸化剤治療ーリウマチ, 眼疾患	21

もっとも演題数が多かったのは抗酸化剤に関するセッションであり、抗酸化剤に対する関心が近年高まりつつあることがよくわかる。生体内抗酸化剤としてよく知られているビタミンEやビタミンC、グルタチオンに関する研究報告が多いのは当然のことであるが、これら以外の生体成分の抗酸化性を検討した報

告が注目された。(例えば、タウリン、フェリチン、プテリン類、ビリルビン、ユビキノロン類、リポ酸、ヘモグロビンなど)。さらに、疾病治療への抗酸化剤の利用に関するセッションが二つもたれたことから、抗酸化剤の生体作用ならびにその臨床への応用開発が重要な研究テーマとなっていることがわかる。また、虚血再還流障害や炎症に関するセッションの報告が多いのは、これらが臨床面において特にフリーラジカルが重要な役割を担う課題であることを示すものである。一方、フリーラジカルの関与が注目されている疾患として癌と動脈硬化症が取りあげられている。特に、動脈硬化症に関しては発症初期の泡沫細胞形成に血しょう中の低密度リポタンパク (LDL) の酸化変性が関わるのがカリフォルニア大学サンジエゴ校の Steinberg らによって見いだされて以来、フリーラジカル研究者の注目を集めている。今回は Steinberg 自身のレビューに続き、LDL の酸化メカニズムとその抗酸化システムに関する研究報告が相次ぎ、動脈硬化発症の分子メカニズムが解明されるのも近いことと思われた。本大会のメインテーマが酸化的障害とその修復ということから、生体の重要な構成成分であるタンパク、脂質及び DNA の障害とその修復機構に関するセッションも開かれた。

タンパクのフリーラジカル障害は近年注目が高まっている研究分野であり、種々のタン



ポスター発表風景

パクの障害とプロテアーゼによる分解に関する発表がみられた。脂質関係では生体膜リン脂質の過酸化反応とそのターナーオーバーや脂質過酸化物の障害発現機構についての報告が注目された。DNA 障害とその修復では特に老化や発癌と関連づけた発表が多くみられ、フリーラジカルの面からの展開がこの領域での有力な研究アプローチとなることがうかがえた。

以上のようにフリーラジカルに関するさまざまな角度からの研究発表が連日続き、この研究分野が世界的な隆盛に向かっていることが実感できた。国別の参加者では地元の米国が最も多かったが、日本人研究者の参加も目だっており、日本からの研究発表が80件を越えていた。日本人研究者の研究レベルの高さとともに、この分野で日本人研究者が量的にも質的にも重要な位置を占めていることが改めて感じられた。ちなみに今回総会において、本学会 (SFRR/International) の次期 president に二木悦雄教授 (東大先端研) が選出された。現在、SFRR の日本人会員は同時に SFRR 日本支部 (SFRR/JAPAN 事務局: 京都府立医科大学第一内科内, Tel 075-251-5505) の会員として登録され、年一回開かれる3泊4日の会合に参加できる (この会合では会員が寝食をとるため、議論が深夜にまで及ぶこともある)。

フリーラジカル・活性酸素が生命現象に深く結びついているとが明らかになるにつれて、この分野に対する研究者の関心は高まっており、今後も益々活発に展開することが期待される。臨床に関連した分野のみならず、広く生物を研究対象としている研究者のこの分野への参加を望みたい。なお、次の会議は1992年6月16~20日に Free Radicals: from Basic Science to Medicine をメインテーマとしてイタリアのトリノ市で開催される。

特別情報

米国における家畜への遺伝子導入技術の開発とその展望 (国際交流シンポジウム「国際アグロバイオビジネスの最前線」における講演要旨)

アイオワ州立大学
Donald C. Beitz 教授
(監修・生研機構 伊地知俊一)

1. はじめに

家畜の遺伝子の導入と伝達については、数世紀にわたって研究者、ブリーダー、そして農家の人たちが世界中で行なってきた。ミルクの生産量の多い牛を選抜したり、成長の早い牛や豚が育種されてきたわけで、これによって子孫に様々な遺伝子が導入、または伝達されてきた。しかしながら、この従来型のブリーディングシステムを使うと好ましくない形質も同時に伝えてしまうという事も起こった。例えば産肉性に優れた豚を選抜したところ偶然、大変ストレスに敏感な豚が選抜されてしまったということがある。

経済的に重要な形質は単一の遺伝子のみではなく複数個の遺伝子が関わっている。一般論だが、経済的に好ましい形質を備えた遺伝子は発現性に問題があり、形質の導入に時間がかかり、また遺伝子間で負の相関性があったりする。例えば、一つの望ましい遺伝子が発現したとしても他の方が欠落したり、または反対の働きをするというようなことになったりする。最近、分子生物学が非常に進歩し、遺伝子の構造についての解明が進み、遺伝子の調節機能についても機序がわかってきた。そのため畜産分野の研究者や獣医は様々な手法を使い、ある特定の動物の持つ遺伝子を他に導入する事により特定家畜の生産性を高める急速な遺伝的改良ができるようになった。

2. トランスジェニック動物生産のステップ

トランスジェニック動物を作成するためにはいくつかの方法がある。例えば、1細胞期での胚、2細胞、4細胞の段階の胚に、さらに出生後のものにある特定遺伝子を導入する

こともできる。現在、アメリカでも実に画期的な実験や研究が行われている。出産後の子供にある特定遺伝子を導入するやり方は、人間を対象とした場合の遺伝子療法的手法としては有望なものかとは思いますが、家畜での適用については、一旦、導入した遺伝子とその形質を子孫に伝える事が出来ないと、現実的には実用性が低いということになる。ブリーダーにとっては導入された遺伝子が子孫に伝えられるということが重要なので、今日の話は胚を利用する手法に限定したい。

(1) 候補遺伝子の特定

トランスジェニック動物生産のステップとして、まず第一に候補遺伝子の特定が必要になる。導入すべき候補遺伝子の特定という仕事では、耐病性、繁殖効率、発育、成育の効率、食肉や羊毛の生産性、ミルクの生産量と組成等、経済的価値の高い形質を特定すべきである。しかしながら、遺伝子を特定することは簡単ではない。というのは、これらの有用な形質は単一の遺伝子によって支配されておらず、かなり多くの遺伝子が関与しているためである。それにもかかわらず家畜改良のために特定作業を進めなければならないが、これまでにかなり研究実績が上がってきている。例えば、主要組織適合性コンプレックス(MHC)に関する遺伝子は免疫機能に関与している。その他の特定遺伝子としては、羊の多産性をコントロールする Booroola 遺伝子、毛色をコントロールする遺伝子、肉牛の生産量を増やす double muscling 遺伝子、それから産肉性にすぐれた豚でよくでるハロセン感受性遺伝子、羊毛のケラチンの遺伝子、ミルク中のカゼイン量をつかさどりチーズの生産量に影響するカゼインの遺伝子等で、これ

ら以外の遺伝子でアメリカでポピュラーなのは成長ホルモンをつかさどる遺伝子がある。非常に新しい遺伝子導入の試みの事例として、羊毛に影響を与えるシスチンの生産に関与する遺伝子を導入したトランスジェニック動物がある。シスチンは羊毛の生産量に関係するが、バクテリアからこの遺伝子を導入することにより羊毛の生産量を調節するというものである。また、新奇な発想として、生化学的な経路で新しいものを作るというかたちで遺伝子導入を使う試みもある。牛のような反芻動物だと酢酸からグルコースを合成することはできないが、植物のようなグリオキシル酸回路に関与している遺伝子を導入することによって反芻動物においてもこれらの糖の合成能力を備えさせようという努力がなされている。

(2) 標的遺伝子の発現の制御

トランスジェニック動物を開発するときの大きな課題の一つは標的である遺伝子をどのようにして制御するかということで、発現の組織特異性というのが重要である。トランスジェニック動物開発の初期にはメタロチオネイン (MT) プロモーターと成長ホルモン (GH) 遺伝子が付けられた合成遺伝子を用いて行われた。MT プロモーターは重金属イオンにより活性化され、成長ホルモン遺伝子を制御し調節するという役割を持っているので、亜鉛を含むような飼料に対して生長ホルモンの合成が促進されたということになる。豚で多くのテストがなされている。豚の場合、このような遺伝子が導入されると赤身と脂肪の割合が好ましい肉ができるが、寿命が短いとか、胃潰瘍の発生が多いとか、骨格、生殖の異常とかの問題がある。このようなマイナスの現象については完全には解明されていないものの、たぶん、遺伝子がランダムに導入された結果ではないかと推測されている。このように MT-GH 遺伝子導入の初期の試みは必ずしも満足のいく結果をもたらさなかったが、トランスジェニック動物を作るときプロモーターの選択が重要であることがわかってきた。プロモーターについていろいろな研究が行われ、actin プロモーターは骨格筋での発現を、 β -lactoglobulin, β -casein, α -SI casein 等

は乳腺での発現を、mitogen regulated protein は胎盤での発現、phosphoenolpyruvate carboxykinase という酵素は特異的に肝臓での発現を制御することがわかってきた。

3. トランスジェニック動物作成の手法

トランスジェニック動物を作成するのに有益な三つの手法がある。まず最初の前核細胞への遺伝子導入だが、マウスを使っていろいろ手がけられている。二番目のレトロウイルスを使った方法、三番目の ES 細胞を使った方法は家畜については、まだ広く応用はされていないがいろいろな試みがなされている。

(1) 前核細胞への遺伝子導入

最初に前核細胞への遺伝子導入だが、最も一般的な方法として家畜で利用されている。まず、最初に 1 細胞期胚を得るために卵胞を刺激し多排卵を誘発、受精後遺伝子導入に適した受精卵を選抜する。次に、透明帯のところからピペットを挿入し前核に遺伝子を導入する。遺伝子を導入するためには前核が見えなければならないので、DIC (differential interference contrast) 顕微鏡を用いる手法が使われる。山羊とか羊とかの胚は DIC 法で前核が見えるが、豚、牛については DIC でも前核が見えないので、胚を遠心分離機にかけ、脂肪球をわきに動かし前核が見えるようにして遺伝子を導入する。このような遺伝子導入の操作では 200 倍から 400 倍の拡大のもとで外径が 1 から 2 ミクロンのマイクロインジェクションピペットで挿入する。この場合に注意しなければいけないのは過剰に注入してはいけないということである。前核細胞がこわれないように、観察をしながらゆっくりと前核がわずかに膨れる程度に 1 ピコリッターくらいを注入する。成功率は思った程よくないが、家畜に比べるとマウスのほうがずっと成功率が高い。マウスの場合、専門家が行うと 25% くらいがゲノムへ遺伝子の導入ができ、そのうちの胚の約 5% くらいに形質が発現される。マウスに比べ豚はずっと低く、ゲノムの中に遺伝子を導入しても必ずしもそれが発現されるということにはならない。例えば、生長ホルモンだが、その遺伝子を導入しても、

当該動物の血中に生長ホルモンがでてくることにはならない。この手法の問題点はルーチンの状態で前核期の胚を生産するということが、注入される遺伝子は500分子位であるが、導入される分子数は0から500とバラツキが大きいことである。それから、導入される部位がランダムである。導入されたとしても必ず発現するとは限らないし、導入された遺伝子が子孫に伝わらないかも知れない。それから一つ一つの胚を個別に扱うという大変な作業があるし、また、子孫の中でそれらの形質を分析するという作業が必要である。以上のような問題点があるが、現段階ではこの手法が最も使われている。

(2) レトロウイルスを利用した遺伝子導入

二番目の手法はレトロウイルスを利用する方法である。レトロウイルスはRNAウイルスで糖タンパクのエンベロップを持ち、感染するとホストの細胞ゲノムの中に遺伝子を移す。これを利用するのがレトロウイルスを使った導入法である。まず、レトロウイルスの病原性を変えなければいけないが、そのために、いわゆる組換えDNAの技術が必要になる。レトロウイルスは細胞特異性、種特異性を持つのである種の利点がある。レトロウイルスを使う手法のメリットは、まず、一個づつ胚を扱う必要がないので前核細胞への遺伝子導入に比べ簡便である。また、1細胞期以外のステージの胚にも使えること、さらに、単一遺伝子のコピーが挿入可能であるということである。また特定のレトロウイルスを選抜することにより、特定組織に対してのトランスフェクションを標的化することが可能である。ただ、欠点もある。多くのレトロウイルスがいわゆる病原性を持つため、実際に使う時にあらかじめ遺伝的に操作し、一部分を改変しなければならないということである。二番目の欠点としては高度な組換え技術と装置を必要とすることである。また、前述の技術と同様に挿入する遺伝子がランダムで場所を特定することができないということである。

(3) 胚性幹細胞 (embryonic stem cell) を利用した遺伝子導入

三番目の胚性幹 (ES) 細胞を利用したトラ

ンスジェニック動物作出の方法は、まず、胚盤胞を採取して幹細胞を作り、遺伝子を幹細胞に導入する。次に、遺伝子を導入した幹細胞を胚盤胞に注入し、この胚盤胞を擬似妊娠状態の動物に移植する。そして、その胎仔を大きくして導入遺伝子が発現しているかどうか、また、その存在を、例えば、精子などを使って確認する。ES細胞を利用することにより、遺伝子が生殖細胞を経由して子孫に伝わっていくので、これがES細胞のもつ利点の一つである。このES細胞は未分化の状態ですべて培養可能である。そして、このES細胞に特定の関心ある候補遺伝子をトランスフェクトし、培養液のなかで遺伝子を組み込んだES細胞を選択することができる。選択され、胚盤胞に注入されたES細胞は胚盤胞内でコロニーを形成し、胎児に移る。そしてトランスファーされたES細胞が、生殖細胞の形成のなかに入り込み、導入された遺伝子が子孫から子孫に継代されていく。この手法は多くの長所を持っており、改変されたES細胞をクローニングすることができる。また、これは選択することができるから、実際にトランスジェニックに利用する前に当該遺伝子に対し導入可能かどうかのテストをすることができる。キメラ等も作れる。この手法で6年間ほど羊をやったがうまく行かず、現在、豚を対象としたテストに入っている。

4. おわりに

有益なトランスジェニック動物を作成するため、いくつかの手法が現在用いられたり、研究されたりしている。現在、一番使用されているのは前核細胞へのマイクロインジェクション法による遺伝子導入であるが、家畜での成功率はマウスに比べ10分の1以下とかなり低い状況にある。また、ES細胞を利用した遺伝子導入は、将来有効な方法だが、まだ、これが実用に供されるまでにはかなり研究開発がなされなければならない。ただ、トランスジェニック動物が家畜の改良に革命を引き起こすということは確実と思われる。

生 研 機 構 出 版 案 内

生研報告 No.11～20 等

生研機構では、平成元年度と2年度に実施した研究会や座談会、それに海外におけるバイオテクノロジー開発動向に関する調査結果を、生研報告No.11～20等として下記のようにとりまとめました。発行部数に限りはありますがいずれも無料です。

ご希望の方は生研機構 企画部（〒160 東京都新宿区新宿6丁目24番16号 日本生命新宿6丁目ビル3階 TEL 03-3205-6565）までご連絡ください。

No.11 海外におけるバイオテクノロジー

「オセアニアにおける植物・家畜分野の研究開発動向調査報告」

内容：1989年3月5日～3月22日に実施したオセアニア調査の報告 A 5版, 94頁

No.12 海外におけるバイオテクノロジー

「アメリカにおける植物バイオテクノロジー研究の現状」

内容：1989年9月16日～9月30日に実施したアメリカ調査の報告 A 5版, 38頁

No.13 海外におけるバイオテクノロジー

「組換えDNA技術実用化の最前線」

内容：標記フォーラムの講演要旨の日本語訳 A 5版, 38頁

No.14 「野菜苗生産の新技术」 内容：標記座談会の要旨 A 5版, 90頁

No.15 「多獲性魚類の加工流通システム」 内容：標記研究会の要旨 A 5版, 56頁

No.16 海外におけるバイオテクノロジー

「イギリス、アメリカにおける動物特許について」

内容：1990年1月20日～2月4日に実施したイギリス、アメリカ調査の報告

A 5版, 78頁

No.17 海外におけるバイオテクノロジー

「欧州マリンバイオテクノロジー研究動向調査報告」

内容：1990年6月2日～6月16日に実施したヨーロッパ調査の報告 A 5版, 70頁

No.18 「食品の機能性を考える」 内容：標記座談会の要旨 A 5版, 95頁

No.19 「海藻利用の現状と将来」 内容：標記座談会の要旨 A 5版, 55頁

No.20 「昆虫の産業利用の現状と展望」 内容：標記座談会の要旨 A 5版, 75頁

調査報告書「農業機械・施設のハイテク化に関する調査」

内容：国内における農業機械・施設のハイテク化等に関する調査報告

平成元年度版, A 5版, 69頁 平成2年度版, B 5版, 87頁

編集後記

医薬や農薬等化学物質の変異原性の評価は、これまで細菌や培養細胞を用いた *in vitro* 試験で行われてきた。本号で紹介した北大・三菱化成総研の共同研究による哺乳動物のチトクロームP-450遺伝子（変異原物質や癌物質の肝臓での代謝に関与する）を導入した形質転換ショウジョウバエの作出は、これまでの

試験法に代って哺乳動物レベルで、簡便、かつ短期間に変異原性を評価できるものとして注目される。将来ヒトのチトクロームP-450遺伝子を導入したショウジョウバエが作出できれば、ヒトにおける変異原物質の評価を可能にするものとして期待される。

(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第26号)

平成3年7月15日発行

発行者 佐野宏哉

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒160 東京都新宿区新宿6丁目24-16 日本生命新宿6丁目ビル3F
TEL. 03-3205-6565 FAX. 03-3205-6566

編集 (社)農林水産技術情報協会

〒103 東京都中央区日本橋兜町15-6 製粉会館6F
TEL. 03-3667-8931 FAX. 03-3667-8933