

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 59 号

JANUARY 15, 1997

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution



胚珠培養法を用いて作出したキク（スワン）とハマギクとの属間雑種の花と葉

左：キク（スワン），中央：雑種植物，右：ハマギク

（本文16ページ参照）

発行＝生物系特定産業技術研究推進機構

総 説

上野川修一

経口免疫寛容の機序…………… 1

国内情報

大橋祐子

植物の傷応答制御遺伝子…………… 5

山下祥子・星 宏良

牛体外受精卵の効率的生産—完全調製済み無血清培地の利用— …… 9

吉崎悟朗・隆島史夫

魚類への効率的な遺伝子導入法の開発……………12

地域の先端研究

長谷川 徹

キクとハマギクとの属間雑種の作出……………16

田畑和男

ミトコンドリア DNA D-LOOP 領域の PCR-RFLP 分析によるマダイの集団解析……………19

文献情報

新技術による B 型肝炎ウイルスに対するワクチン作製へのアプローチ……………23

着床前マウス胚の分化に対応するタンパク質……………24

各系統プリオンタンパク質の分子解析と新種のクロイツェル・ヤコブ病の病因について……………24

酵母細胞壁タンパクが GPI グリカンを介してグルカンと結合している証拠……………26

海外便り

町田幸子

細胞内小胞輸送における膜タンパク質の機能解析

—Memorial Sloan-Kettering Cancer Center での 2 年—……………27

特別情報

大島泰郎

「火星生物発見」の報告について……………30

経口免疫寛容の機序

東京大学大学院農学生命科学研究科

上野川修一

経口的に摂取した抗原タンパク質に対する特異的な免疫抑制を経口免疫寛容という。経口免疫寛容は食品アレルギーの抑制のために配備された生体免疫機構である。経口免疫寛容の誘導は、経口投与抗原によって免疫系における代表的な細胞であるT細胞が麻痺状態に陥った時に観察される。この経口免疫寛容現象は最近では、原因タンパク質の投与によって積極的にアレルギーや自己免疫疾患を治療するのに応用されている。

1. はじめに

生物は進化の過程において、生命の維持に必要な栄養源の摂取に関して見事なほどの適応を示している。例えばマクロファージのような下等な生物は、単に細胞外のものを受け、これを分解し自分のからだの運動のエネルギーにしたり、あるいは自分のからだの構築に使っている。しかし同様な栄養源の摂取において高等な哺乳動物ではより複雑な方法、すなわち消化器官という精密な装置を通して体内に取り込み、生命を維持している。さらに詳細を見ると、いずれの場合も自分にとって有益物質を取り込み、それ以外は排除することに関しては共通している。生命は自己にとって有利なものは受諾し、不利なものは排除することによって成り立っているのである。このようなしくみが最も顕著に観察されるのが免疫系である。

免疫系は生体を攻撃する外来の侵入者である病原細菌やウイルスを自己の成分と識別してこれを排除する機構である。この機構が成立することによってわれわれのからだのなかで病原細菌やウイルスが増殖するのを抑え、その結果生命が維持されているのである。しかしながら、病原細菌やウイルスなど悪玉と

同時に善玉である栄養源、とくにタンパク質などの侵入すなわち栄養の摂取を抑えてしまつては生命を維持することができない。そこでこのような免疫系による排除機構を善玉が入ってきたときにのみ抑えようとするのが今回述べる経口免疫寛容である。また善玉である食品が体内に入ったときに、アレルギーを起こすことがある。この食品を原因とするアレルギーの発症を防いでいるのも、実はこの経口免疫寛容である。

この経口免疫寛容は免疫抑制機構であるから、これを積極的に利用してアレルギーや自己免疫疾患を治療する試みが行われるようになった。有望な免疫療法の一つと期待されている。本稿では、この経口免疫寛容の機構とその利用について述べたい。

2. 経口免疫寛容の歴史的な背景

中国の漆器職人が、自分の子供が漆にかぶれる（すなわちアレルギーによる）のを防ぐため漆を食べさせたという話が伝わっている。これが経口免疫寛容に関する最も古い伝聞とされている。この事実は古い時代に人類はこの興味ある生体の機能をすでに経験的に認識していたことになる。この経口免疫寛容が科学的に免疫学的な現象として記載されたのは、今世紀の初頭である。鶏卵に対する強い免疫学的なショック（アナフィラキシー）が鶏卵

を経口投与することにより軽減したことが、モルモットを用いた実験で確認されている。その後、他の動物や人間でも同様の現象が報告されている。しかしながら、いずれの場合も、現象の確認にとどまり、その機構が分子・細胞レベルで研究されるようになったのは、ごく最近のことである。前述したように、この現象がアレルギーや自己免疫疾患など免疫過敏症の治療に利用できるとの報告が発表されるようになって特に研究が進み始めた。

3. 経口免疫寛容を誘導する抗原物質

経口的に体内に摂取された物質（大部分の場合食品成分である）のなかで寛容を誘導できるのは主としてタンパク質である。これ以外では分子量が1000以上のペプチドあるいは体内のタンパク質と結合した低分子化合物も寛容を誘導できる。

経口免疫寛容が誘導されているか否かは次のような方法で確認できる（図1）。すなわち、あらかじめ経口的にタンパク質を与えてマウスにしばらくしてから同じタンパクを免疫する。対照としてタンパク質を経口投与しないマウスにも免疫する。その後、つくられた抗体の量やT細胞の増殖性を測定すると、前者すなわち経口的に抗原を投与した場合には、抗体も産生されないし、T細胞も増殖しない。これに対して後者では、抗体の産

生もT細胞への増殖も認められる。前者の場合は経口投与抗原による経口免疫寛容状態が誘導され、その結果免疫学的に不応答になったと考えられる。

経口抗原の量も経口免疫寛容の誘導に影響を与える。一般に投与量の多い方が寛容を誘導しやすい。抗原の種類が異なってもこのような傾向は認められるが、抗原ごとに誘導能には差がある。たとえば、乳タンパク質においても球状タンパク質であるβ-ラクトグロブリンの方が、明確な立体構造をとらないα_{s1}-カゼインに比べ、低量でより強い寛容を誘導する。

また、経口投与抗原量が多い場合と少ない場合では、寛容誘導の免疫学的機構が異なる場合があるとされている。

4. 経口免疫寛容を誘導する器官

経口免疫寛容を誘導する器官については、多くの候補が挙げられている。最も有力視されている腸管の免疫系である。腸管の免疫系パイエル板と腸管上皮内リンパ球に大別される。それぞれを構成する免疫細胞の分布や種類のかなりの部分が異なっており、別の機能をもっているものと推定されている。しかしながら、現在のところ、どちらが経口免疫寛容に関与しているのか明確となっていない。また、これとは別に腸管免疫系以外の免疫器官が関

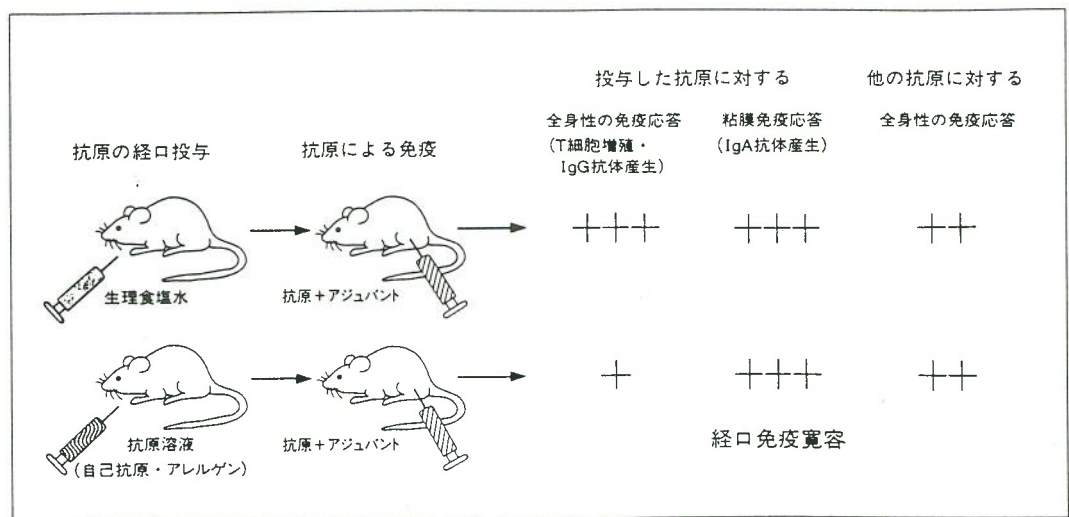


図1 動物実験による経口免疫寛容の誘導と効果

与している（たとえば肝臓）との報告もあり、さらに詳細な研究が必要である。いずれにしても、経口免疫寛容に関与する器官の同定は、この問題を研究する上で極めて重要であり、今後の研究が期待される。

5. 経口免疫寛容の機構

経口免疫寛容の分子細胞機構が研究され始められている。免疫応答の機構は他の生理機構と同様に正と負の反応から構成されている。抗体やサイトカインの産生などが正の反応とするならばこれらを抑制するのが負の反応である。免疫寛容の場合は、免疫反応が抑制されているかあるいは反応が起こらない状態をいう。経口免疫寛容は抗原が経口的に投与された場合に、免疫抑制あるいは不応答が誘導

されることである。負の免疫反応の代表的な機構としては、代表的な免疫細胞であるT細胞のうちCD8陽性T細胞が抗原の刺激を受けて抑制性の免疫調節因子を産生し、これが免疫反応を抑制する（アクティブ・サブプレッション）場合と、抗原の刺激によってT細胞とくにCD4陽性T細胞が麻痺（不応答）状態になる場合（アナジー）がある。それぞれの現象の分子細胞機構については現在、細胞表面でのシグナルの受容機構とそしてシグナルの細胞内伝達機構について詳細に研究が行われつつある。経口免疫寛容も現在上記した免疫系の負の制御機構を中心に同様の現象が起こるのではないかと想定されている。しかしながら、腸管免疫系には独特の細胞や分子が存在していることから、経口免疫寛容の場合には独特の機構が存在する可能性もある

表 1 経口免疫寛容による自己免疫疾患の治療効果

(モデル) 疾患名	経口投与抗原	T細胞応答抑制	抗体産生抑制	症状改善
動物実験				
実験的自己免疫性脳脊髄炎	ミエリン塩基性タンパク質	あり	あり	あり
コラーゲン誘導性関節炎	II型コラーゲン	あり	あり	あり
実験的自己免疫性糖尿病	インスリン			あり
実験的自己免疫性ブドウ膜炎	S抗原	あり		あり
実験的自己免疫性重症筋無力症	アセチルコリン受容体	あり		あり
臨床試験				
多発性硬化症	ミエリン	あり		なし
慢性関節リウマチ	II型コラーゲン		なし	あり
ブドウ網膜炎	S抗原			

表 2 経口免疫寛容によるアレルギー疾患の治療

経口投与抗原	T細胞 応答抑制	抗体産 生抑制	症状改善
動物実験			
スギ花粉	あり		
卵白アルブミン	あり		
ニッケル、クロム	あり		あり
臨床試験			
シラカバ花粉		あり	あり
干し草花粉			あり
トウモロコシ花粉			あり
ブタクサ花粉			あり
ヨモギ花粉			あり
ダニ	あり	なし	あり
ネコ鱗屑		なし	なし
ニッケル、クロム			あり

ものと考えられている。

6. 経口免疫寛容のアレルギー、自己免疫疾患治療への応用

冒頭でも述べたように過敏な免疫反応で発症する疾患、すなわちアレルギーや自己免疫疾患の治療に経口免疫寛容を積極的に利用する試みがなされている。すべてのアレルギーや自己免疫疾患において治療効果が認められている訳ではないが、顕著な効果が見られたとの報告もある。経口免疫寛容を治療に応用した例とその結果を表1、表2にまとめたので参考にさせていただきたい。

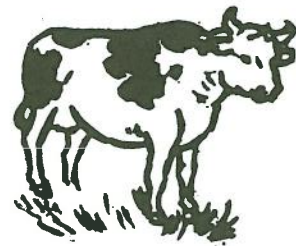
7. おわりに

われわれの生体の興味あるしくみである経口免疫寛容について述べてきた。免疫系は、他の生体系とはやや異なり、その働きに気づきにくい。免疫が関連する病気になってはじめてその重要性に気づくことが多い。経口免疫寛容のしくみの場合も例外ではない。しかし、このしくみが存在してはじめてわれわれが食べ物を安全に摂取できたり、あるいはアレルギーや自己免疫疾患にならずにすんでいるのである。このような事実を本稿を通じて理解いただければ幸いである。

文 献

- 1) Weiner, H. L. *et. al.*, (1994) *Annu. Rev. Immunol.*, 12: 809-837
- 2) Weiner, H. L. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 10762-10765
- 3) Kaminogawa, S. and A. Ametani (1996), in "Structure of Antigen", ed. by M. H. V. Van Regenmortel, CRC Press, Boca Raton, Florida
- 4) Kaminogawa, S. (1996) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60: 1749-1756
- 5) 上野川修一・八村敏志 (1993) *細胞工学*, 12: 374-376
- 6) 上野川修一 (1994) *Immunology Frontier*, 4: 439-445
- 7) 上野川修一・久恒辰博 (1994) *蛋白質・核酸・酵素*, 39: 2090-2101
- 8) 戸塚護・上野川修一 (1995) *アレルギーの領域*, 2: 43-48
- 9) 八村敏志・上野川修一 (1996) *臨床免疫*, 28: 696-704
- 10) 西島謙一・上野川修一 (1996) *医学のあゆみ*, 117: 364-367

以上は経口免疫寛容に関する英文および和文の総説・解説である。参考にされたい。



植物の傷応答制御遺伝子

農林水産省 農業生物資源研究所
大橋祐子

植物は虫に食べられたり、風雨による倒伏を受けたりして傷を受けると、今まで働いていなかった傷応答性の遺伝子群を新たに活性化し、さらなる虫害を防ぎ、傷口からの病原体の感染を阻害するような防御タンパク質の生産を促す。我々は、傷によって1分以内にその mRNA が蓄積する新規の遺伝子を単離した。さらに、これは植物の傷応答反応のみならず、病原体感染に対する抵抗性をも制御する重要な遺伝子であることが示唆された。

1. はじめに

外界の刺激に対する植物の応答反応は、古くからよく調べられてきた。接触刺激によるオジギソウの葉の運動などは、肉眼的に観察できるために、その機構は多くの人の興味をひいている。しかし、ある刺激がどのような機構で細胞内に伝わっていくのか、その情報を伝達する物質は何か、などの分子レベルでの研究はまだ始まったばかりである。傷は、植物にとって日常的に受ける外的ストレスである。しかも、致命傷という言葉が示すように、自己の生存にも関わる重要な障害となる。我々は、この傷に対する植物の自己防御反応を理解する上で非常に重要と思われる遺伝子を単離した。ここではこの遺伝子の特性と、傷および病原体感染から植物の抵抗性反応発現に至る情報伝達について述べる。

2. 遺伝子の単離とその特性の解明

我々は植物の病気に対する抵抗性の機構を明らかにしたいと考えて実験を行っている。この遺伝子はこれらの研究を行う中で単離されてきたものである。そこでまず最初に植物の病害抵抗性機構について簡単に述べる。

植物の病原体感染に対する最も明瞭な抵抗性のかたちは、病原体を感染部位に封じ込めるための積極的な細胞死、すなわち過敏反応であろう。ある病原体に抵抗性の宿主は、病原体の感染を受けるとその細胞に自殺するように運命付ける。細胞死に伴い、その細胞中の液胞が壊れ、その中に局在していたポリフェノール類が酸化されて褐変し、肉眼的に認められる病斑となる。やがてその部分は乾燥する。この過程でこの細胞内で増殖していた病原体も殺される。そして病斑周辺にさらなる病原体感染を阻害すべく、多種の低分子シグナル物質を誘導し、防御遺伝子を活性化させて抵抗性を獲得する。植物にとっては、病斑が出来ることは、組織内部に激しい傷ができるのと同じと思われる。実際に、病斑形成に伴って、傷で誘導されるジャスモン酸が多量に生成するし、傷誘導性のタンパク質(塩基性 PR タンパク質)群も多量に検出される。また、病斑部およびその周辺では、サリチル酸の生成も起こり、サリチル酸誘導型の酸性 PR タンパク質群もそれに伴って誘導されてくる。酸性 PR タンパク質は、傷誘導型で液胞局在型の塩基性 PR タンパク質とはアミノ酸配列レベルでは相同性をもつものもあるが、細胞外に分泌されること、傷やジャスモン酸では誘導を受けないことで、全く異なったタイプのタンパク質と言える。これら PR タンパク質は、*in vitro* 実験や、これら

の遺伝子を導入した組換え植物を用いた実験から、病原体感染に対する抵抗性を誘導する防御タンパク質と考えられる。

このような意味で、病斑形成自体がこれら防御遺伝子誘導の原因になっていると考えられる。そこで我々は、まず病斑形成の機構を少しでも明らかにしたいと考え、病斑形成の初期に特異的に発現する遺伝子の単離を行った。そしてその中に、MAP キナーゼと相同のタンパク質をコードする遺伝子 *DS22* が含まれることを発見した。MAP キナーゼは、動物や酵母で様々な細胞外刺激で活性化され、細胞の増殖や分化に関与することが知られているリン酸化酵素である。いわゆる情報伝達系、MAP キナーゼカスケードの中心メンバーとして働くと言われている。自身も MAP キナーゼに特異的なアミノ酸配列 TEY の T (スレオニン) と Y (チロシン) の両者がリン酸化されることによって活性化され、情報伝達の下流にあるタンパク質 (転写因子など) をリン酸化することによって情報を伝え、遺伝子発現等を制御すると考えられている。植物でも、これと相同なタンパク質をコードする遺伝子はいくつか単離されているが、その機能についてはほとんど明らかになっていない。

最初に、我々がタバコから単離した *DS22* 遺伝子の特性を調べた。この遺伝子由来のタンパク質を融合タンパク質として細菌に作らせたところ、これは自己リン酸化活性をもち、MAP キナーゼの基質のひとつであるミエリン塩基性タンパク質をリン酸化する活性をもっていた。また、その mRNA は、健全なタバコの葉や茎頂では検出されないが、茎ではわずかに、また根では多量に恒常的に検出された。また、サリチル酸、エチレン、アブシジン酸では誘導されず、ジャスモン酸では誘導がかかった。

3. *DS22* 遺伝子の傷に対する応答性

前述のように、ジャスモン酸で誘導がかかる塩基性 *PR* 遺伝子群は、傷によっても誘

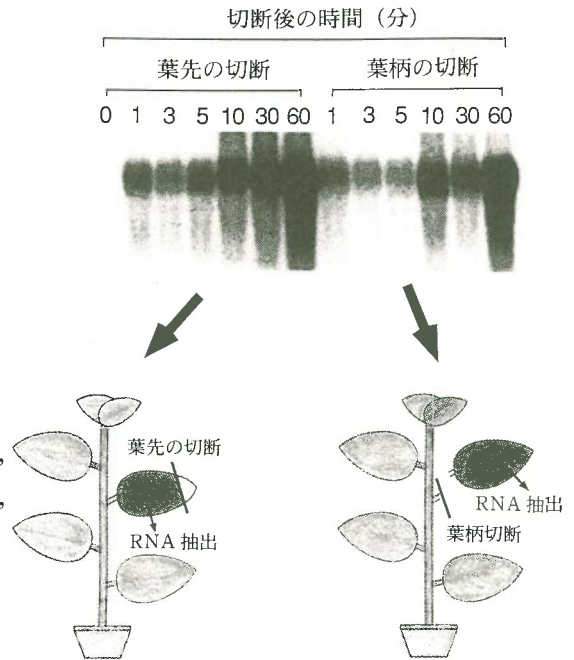


図1 切断による *DS22* 遺伝子の mRNA の蓄積導がかかる。そこで、*DS22* の傷応答性を調べてみたところ、やはりポジティブで、しかも葉の表面を傷つけて1分以内にその mRNA のレベルが増加し、1時間で最高になり、その後急激に減少することが明らかになった (図1)。刺激に対して転写レベルでこのように早い応答を示す遺伝子は、今まで動植物を通して知られていない。*DS22* の誘導は傷に特異的で、葉を揺らしたり、繰り返してさわったりしても全く誘導されない。そこで我々はこの遺伝子を傷誘導性タンパク質リン酸化酵素 (Wound-Induced Protein Kinase: 略して *WIPK*) 遺伝子と命名した。この mRNA レベルの上昇は、傷を付けた植物において全身的に誘導される。すなわち、傷シグナルは非常に速く全身に伝わり、*WIPK* 遺伝子の発現を誘導させるらしい。このシグナルの実態はまだよく分かっていない。

4. *WIPK* 遺伝子を導入した組換え植物における傷応答性

WIPK の機能を調べるために、この cDNA をタバコで恒常的に発現させるべく、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターに連結して、アグロバクテリウム感染を介し

てタバコに導入した。得られた組換え体には特に変わった形態は認められず、正常に生育し、種子をつけた。mRNA の発現レベルの高い組換え個体を選び、この植物における傷応答性を調べた。導入遺伝子には *nos* 由来のターミネーターを用いているので、その mRNA の大きさは、内在性のこの遺伝子のものより少し小さく、この組換え体の中でどちらの遺伝子が働いているのかが区別できる。非組換えタバコの葉に傷をつけると、前述のように一過的に *WIPK* mRNA の蓄積が認められる。組換え体では、導入遺伝子由来の転写産物は傷によって全く影響を受けずに恒常的に多量に検出されるが、内在性の *WIPK* 遺伝子は、傷による誘導が全く起こらなくなっていた。MAP キナーゼ活性を調べてみると、非組換え体では、傷によって一過的に非常に速い活性増が誘導されたが、組換え体では、恒常的に非常に低いレベルの活性が検出されたのみで、傷による誘導は全く起きなかった。さらに、この組換え体では、傷によって誘導される筈の塩基性 PR タンパク質群が傷付けても全く誘導されなくなっていた。そして、驚いたことに、通常、傷では誘導されない筈の酸性 PR タンパク質群が傷によって誘導されてきた。この全く思いがけない現象に、我々は息をのんだ。次に行うべきことは何か。そこで、まず傷誘導性の遺伝子群の誘導シグナルであるジャスモン酸を定量してみた。すると、非組換え体では明瞭な傷による増加が認められるのに、組換え体では、果たして、傷による誘導は全く見られなくなっていた (図2)。すなわち、この組換え体では、傷によって生成する筈のジャスモン酸が出来なくなっているため、ジャスモン酸誘導性の遺伝子群の発現も起こらなくなっていると説明出来る。また、酸性 PR タンパク質遺伝子群の誘導シグナルであるサリチル酸含量を調べてみると、ここでも、意外なことに、通常は傷で誘導されることのないサリチル酸が、この組換え体中では、傷によって誘導を受けていたのである (図2)。傷による異常な酸性 PR タンパク質遺伝子群の誘導についても、

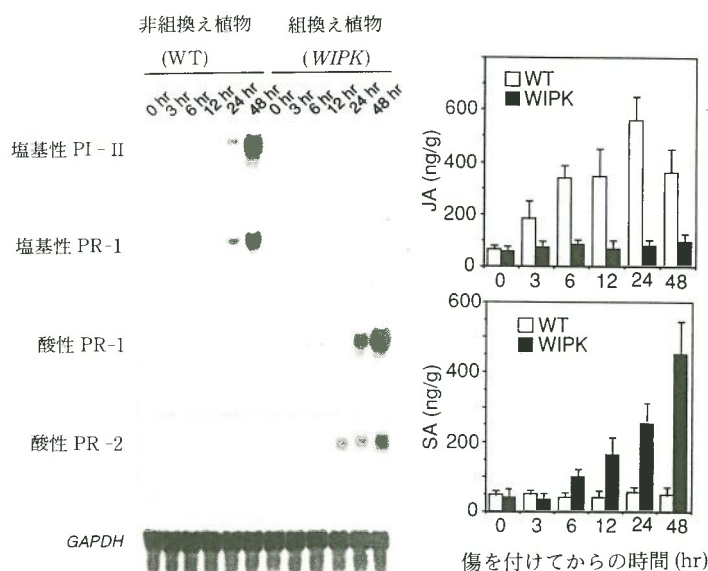


図2 *WIPK* 遺伝子を導入した植物で観察される傷害応答性の欠如と傷によるサリチル酸情報伝達系の活性化
JA: ジャスモン酸, SA: サリチル酸

このサリチル酸の傷による異常な生成によって説明ができる。

6. *WIPK* 植物における病害抵抗性

サリチル酸は植物の病原体感染に対する抵抗性のシグナルとなっていることが分かっている。この組換え体に傷をつけるとサリチル酸が誘導されるとすれば、実際に抵抗性が認められるであろうか。そこで TMV を接種して経時的に病斑の直径を測ってみたところ、

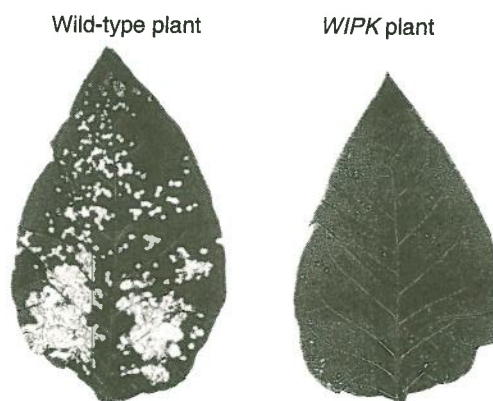


図3 *WIPK* 遺伝子を導入したタバコに誘導された TMV 抵抗性

左: 非組換え植物, 右: *WIPK* 植物
TMV を接種11日後に観察された死病斑, 病斑の直径はウイルスの増殖の程度を表わす。組換え体では病斑の直径が小さく抑えられている。

組換え体では明らかな抵抗性の増強が認められた。サリチル酸含量を測ってみても、対照のタバコよりも高いレベルが誘導されてくることが分かった(図3)。

7. 傷や病斑形成シグナル伝達機構

以上述べてきたように、WIPKは傷害シグナルであるジャスモン酸のレベルを正に制御していることが示唆された。さらに、我々は最近、WIPK特異抗体の使用、やMAPキナーゼ活性の測定、活性化WIPKのリン酸化アミノ酸解析などの結果から、WIPKの転写が起こっている時にはWIPK活性も検出できること、活性化されたWIPKが存在する時には、ジャスモン酸が検出され、塩基性PRタンパク質遺伝子の発現も起こっていることを明らかにした。これらの結果は、WIPKの活性化によりジャスモン酸合成系が誘導され、傷情報伝達系のシグナルスイッチが入ることを示唆している。前述のWIPK組換え植物では、内在性WIPK遺伝子がロックアウトされた状態になっていたもので、傷応答が全く起こらなくなっていたものと思われる。WIPKによる傷害情報伝達機構については、現在不明であるが、動物の系では、植物の傷応答とよく似た炎症反応を引き起こすアラキドン酸カスケードについての研究が進んでおり、以下のように考えられて

いる。サイトカインによって引き起こされる炎症反応の初発反応の一つは、細胞質フォスホリパーゼA2の活性化である。これはMAPキナーゼの標的タンパク質の一つであり、MAPキナーゼによってリン酸化による活性化を受け、細胞膜に移動する。そして膜脂質を分解し、アラキドン酸を遊離させ、ジャスモン酸と構造のよく似たプロスタグランジン産生を促すというものである。WIPKの標的タンパク質の検索、WIPKをリン酸化によって活性化させるこの情報伝達系の上流の因子の検索、および活性化されたWIPKの核移行の有無、は今後の検討課題である。

8. おわりに

このリン酸化酵素、WIPKは傷情報伝達の切り札的媒介者であることが示された。さらに興味あることは、WIPKの活性化が起こらない場合には傷によってサリチル酸が誘導されることである。傷によってジャスモン酸ができるか、それともサリチル酸ができるかは、このWIPKが制御しているように思われる。その機構は何であろうか。今後これらの道筋が解析されることにより、植物の病傷害応答機構や抵抗性の機構も理解出来るようになるだろう。さらに、これらの知見が有用植物作出などに貢献することを期待している。

牛体外受精卵の効率的生産 —完全調製済み無血清培地の利用—

(株)機能性ペプチド研究所

山下祥子・星 宏良

牛体外受精卵の作製技術は、基礎的研究のみならず、実用的先端畜産バイオテクノロジーの重要な基盤技術として認識されている。しかし、現在用いられている体外受精卵の体外培養系にはいくつかの問題点が指摘されている。本稿ではユーザーによる培地調製の手間を省略した完全調製済み無血清培養液キットを利用し、牛体外受精卵を効率的に生産する新しい培養方法について紹介する。

1. はじめに

牛体外受精卵（胚）の作製技術は、卵子の成熟、体外受精、胚の発生などの生物現象を解明する基礎的研究のみならず、体外受精卵移植による子牛の生産、核移植によるクローン牛の作出、遺伝子導入されたトランスジェニック牛の作出など、実用的先端技術としても注目を集めている。

通常、受精卵移植に利用される胚盤胞を体外培養系で効率的に生産するためには、血清添加培地の使用や、卵丘／顆粒膜細胞や卵管上皮細胞などの体細胞と胚を共培養することが行われている。しかし、血清添加培地や、体細胞を用いた牛体外受精卵の培養にはいくつかの問題点が指摘されている。血清中には、卵子の成熟や胚発生に対して有効な因子だけではなく阻害因子も含まれているため、血清ロットにより生物活性が大幅に異なる。そのため、優良なロットを選定するために多大な労力と時間がかかる。さらに、血清は生体材料であるため、ウイルス、細菌、マイコプラズマ汚染の恐れがある。体細胞を用いた共培養法は、体細胞を胚とは別途に培養する手間がかかること、体細胞の培養状態により胚の発生率が大きく変動すること、などの問題がある。

そこで、体細胞との共培養を必要とせずに無血清培地で効率的に牛体外受精卵を生産する培養システムの開発が望まれている。ここでは、ユーザーが培養液の調製を必要とせずに一連の培養操作が可能な完全調製済み無血清培養液キット（エンブリオパック）を用いて、牛体外受精卵を効率的に生産する新しい方法について紹介する。

2. 無血清培地による牛体外受精卵の生産

機能性ペプチド研究所で開発した完全調製済み無血清培養液キットを利用した牛体外受精卵の生産方法について紹介する。

イ) キットに含まれる主な培養液

①卵子回収液（OCM）

ダルベッコーリン酸緩衝液にグルコース、ピルビン酸、ヘパリンなどが添加された、卵子の生存維持や採卵操作中の血液凝固を防ぐ卵子回収液。

②卵子成熟・共培養培養液（IVMD101）

TCM199培地を改良した基礎培地に TGF- α やインシュリンなどのポリペプチド性因子を添加した無血清培養液。

③媒精液（IVF100）

BO 液¹⁾を基本として改良を行い、受精能獲得のためにヘパリン、カフェイン、BSA を添加し、pH 変化を抑制して長期間保存できるように HEPES を加えた媒精液。

④裸化受精卵用培養液 (IVD101)

TCM199培地のグルコース濃度を60%削減し、代替りのエネルギー源としてピルビン酸、乳酸を添加、抗酸化剤としてタウリン、システインを含み、胚発生促進物質として、FGF-2, TGF- β , TIMP-1などのポリペプチド因子を添加した無血清培養液。

ロ) 屠体卵巣からの卵子回収

卵巣は屠殺後すぐに採取し、20°C前後に保温して実験室に持ち帰る。卵巣を滅菌生理食塩水で十分に洗浄し、細切法または吸引法により、未成熟卵子を卵子回収液中に集める。卵子回収液で数回洗浄した後、緊密な卵丘/顆粒膜細胞に囲まれ、細胞質顆粒が均一な卵子を選別し体外成熟培養に用いる。

ハ) 未成熟卵子の体外成熟

一般的に、卵子の成熟には、培養液中に血清、ゴナドトロピン (FSH, LH), エストロジェンなどを添加して用いる^{2,3)}。最近、ポリペプチド性細胞成長因子である上皮細胞増殖因子 (EGF) やトランスフォーミング増殖因子 (TGF- α) に強力な卵子成熟促進活性を見出した⁴⁾。EGF および TGF- α は、大腸菌を用いた遺伝子組換え技術で大量にかつ安価に生産でき、血清, FSH, LH, またはエストロジェンを利用するよりも低コストで培地の製造が可能である。

直径 60mm のプラスチックシャーレに卵子成熟、共培養培養液 (IVMD101) で 350 μ l のドロップを作成し、回収、選別した卵子を、1 ドロップ当たり約 30 個づつ入れ、38.5°C, 5%CO₂/95%空気の培養条件で 24 時間体外成熟培養を行った。この培養液を用いると著しい卵丘膨潤、すなわち、卵子の成熟が観察され、90%以上の卵子が受精可能な第 2 減数分裂中期に移した。

ニ) 体外受精

凍結精液ストローを約 38°C の温水で急速に融解し、38.5°C に保温した媒精液 (IVF100) 約 5 ml に懸濁する。遠心操作により精子の

洗浄を行った後、媒精液を加えて懸濁し、 1×10^7 個/ml となるように調整する。最終的に 5×10^6 個/100 μ l ドロップとなるように精子濃度を調整し、成熟培養後の卵子をドロップに移し、38.5°C, 5% CO₂/95% 空気中で 6 時間体外受精を行う。この方法により、用いた卵子数当たり、80% 以上の受精率が得られる。しかし、種雄牛によっては体外受精率が低いものもあり、媒精液の改善が必要である。

ホ) 体外胚培養

(a) 卵丘/顆粒膜細胞を用いた共培養法

牛胚を従来の方法で体外培養すると、8~16細胞期で発生が停止することが知られている⁵⁾。胚の発生阻害を解決するために、卵丘/顆粒膜細胞などの体細胞との共培養や、血清を添加した培地の使用が有効であることが報告されている^{6,7)}。私達の研究で、無血清培養された卵丘/顆粒膜細胞と胚の共培養で、良好な胚発生が誘導されることを確認した^{8,9)}。この操作は、媒精 6 時間後に胚を洗浄し、直径 60mm プラスチックシャーレにコラーゲン処理し、IVMD101 培養液で 350 μ l のドロップを作成し、それぞれ約 30 個の胚を移し入れ、38.5°C, 5%CO₂/95%空気の条件で培養を行った。シャーレにコラーゲン処理を行うのは、無血清培養液でも卵丘/顆粒膜細胞が良好に接着し、伸展するのを可能にするためである。培養 2 日後、キャピラリーピペットで周囲の卵丘/顆粒膜細胞を胚からはがし、培養を続けた。無血清培養液を用いた培養ではこの操作は容易である。この無血清共培養法では供試卵子数当たりの胚盤胞形成率は 31.9% となり、一般的に行われている血清添加培地での卵丘/顆粒膜細胞を用いた共培養法 22.3% に比べ高い値となった (表 1)。

(b) 体細胞を用いない非共培養法

卵丘/顆粒膜細胞などの体細胞が胚発生促進活性を有する要因には、これらの体細胞が胚発生促進物質を合成・分泌すること、培養液や培養環境での胚発生阻害因子の除去、な

表1 エンブリオバック（共培養，非共培養）及び血清培地で培養された牛体外受精胚の発生

培養条件	供試卵子数	発生した胚の数 (%)		
		2細胞期	8細胞期	胚盤胞
エンブリオバック（無血清培地）				
共培養	94	81(86.2%)	60(63.8%)	30(31.9%)
非共培養	98	88(89.8%)	60(61.2%)	33(33.7%)
血清培地				
5%子牛血清	121	98(81.0%)	55(45.5%)	27(22.3%)

どが考えられている。私達の研究で、卵丘／顆粒膜細胞が合成・分泌する組織性メタロプロテアーゼインヒビター（TIMP-1）が胚発生促進活性を有することを明らかにした¹⁰⁾。さらに、市販のTCM199培地に含まれるグルコースや通常培養条件下での酸素濃度が胚発生に悪影響を及ぼしており、これらを卵丘／顆粒膜細胞が消費することで胚の発生に至適な環境を作り出していることが明らかとなった¹¹⁾。媒精後、コラーゲン処理された直径60mmプラスチックシャーレにIVMD101培養液で350 μ lのドロップを作り、それぞれ約30個の胚を移し入れ、38.5°C、5% CO₂／95%空気の条件で24時間培養を行った。次に、直径60mmプラスチックシャーレに裸化受精卵培養液IVD101培養液で350 μ lのドロップを作り、極細のピペットを用いて胚から卵丘／顆粒膜細胞を剥離し、約30個の胚を移し入れ培養した。この時の培養条件は、38.5°C、5% CO₂／5% O₂／90% N₂の低酸素分圧で行った。この場合の胚盤胞形成率は33.7%と高い値が得られた（表1）。この培養法は、胚の生理的濃度である低酸素条件が重要であり、窒素封入できる培養チャンバーか、酸素分圧をコントロールできる炭酸ガスインキュベーターの利用をすすめる。

3. おわりに

牛体外受精胚を生産するためには、多くのユーザーは、種々の培地を独自に調製しているのが実状である。しかし、毎回培養液を調製するため、作業が煩雑になるうえに培養液の生物活性を毎回安定に保つことが難しいという問題がある。完全調製済み無血清培養液

キットには、屠体卵巣の卵子回収から移植可能な牛体外受精胚生産の操作に必要なすべての培養液が含まれている。この培地キットの特長は、卵子の成熟促進活性や胚発生促進活性を示すポリペプチド性生理活性物質等が培地に添加されていること、牛胚の体外発生に適した基礎培地の改良などがあげられる。特に共培養を必要としない裸化受精卵用無血清培養液は、少数での胚培養にも適しており、個別別に採取した屠場卵巣からの体外受精卵¹²⁾、生体内採卵による体外受精卵などの効率的な生産に利用が期待される。

牛や羊の体外受精卵移植により生まれた産仔は、人工授精や体内受精卵移植により生まれた産仔に比べて出産時の平均体重が重く、難産や早死産が多いという事例が報告されている¹³⁾。ごく最近このような現象は羊において体外受精卵のすべてに共通するのではなく、血清を添加した培養液で生産された受精卵に特異的な特異的な現象であることが示唆され、無血清培地により優良品質の体外受精卵を生産できることが期待される¹⁴⁾。

最後に、本研究開発の推進につきましては、生研機構ならびに（社）畜産技術協会のご多大のご支援をいただきましたことに心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Brcakett, B. G and G. Oliphant (1975) *Biol. Reprod.*, 12 : 260-274
- 2) Eppig, J.J. (1980) *Biol. Reprod.*, 23 : 545-552
- 3) Eppig, J. J and S. M. Downs (1984) *Biol. Reprod.*, 30 : 1-11
- 4) Kobayashi, K. *et al.* (1994) *J. Reprod.*

- Fertil.*, 100 : 439-446
- 5) Wright, R. W. and K. R. Bondioli (1981) *J. Anim. Sci.*, 53 : 702-729
- 6) Kajihara, Y. *et al.* (1987) *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 33 : 173-180
- 7) Fukui, Y. and H. Ono (1989) *J. Anim. Sci.*, 67 : 1318-1323
- 8) Hoshi, H. *et al.* (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 27A : 578-584
- 9) Takagi, Y. *et al.* (1995) *J. Mamm. Ova. Res.* 12 : 15-21
- 10) Satoh, T. *et al.* (1994) *Biol. Reprod.*, 50 : 835-844
- 11) Kobayashi, K. *et al.* (1994) *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 30A : 556-558
- 12) 星 宏良 (1995) 畜産の研究, 49 : 37-42
- 13) Walker, S. K. *et al.* (1996) *Theriogenology*, 45 : 111-120
- 14) Thompson, J. G., *et al.* (1995) *Biol. Reprod.*, 53 : 1385-1391

国内情報

魚類への効率的な遺伝子導入法の開発

東京水産大学
吉崎悟朗・隆島史夫

魚類への遺伝子導入は基礎研究および水産育種の分野において、近年非常に注目されている技術である。魚類は体外受精を行い、大量の卵、精子が得られるという利点を持つ反面、その卵膜は硬く、受精卵の核を確認することが非常に難しい。そこで、これらの問題点を克服するため、独自の遺伝子導入技術が用いられている。本総説では、われわれの研究室で開発した技術を中心に、最近の遺伝子導入魚作出技法について概説する。

1. はじめに

個体への遺伝子導入技術は、目的の遺伝形質のみを導入することができ、導入した遺伝子が一度宿主の染色体中へ組み込まれれば、その遺伝子は次世代へ遺伝していくという利点を持つ¹⁾。

魚類においてもこの技術は様々な方面の研究に利用されている。基礎研究分野においては、遺伝子のプロモーター、エンハンサーなどの *cis-acting element* の機能解析や、導入遺伝子に由来するタンパク質の生理機能の解析などに用いられている²⁾。また、これらの技術は魚類育種へも応用されている³⁾。すなわち、目的の有用形質を担うタンパク質が同定されている場合、その遺伝子を単離、改変した後に個体へ導入すれば、その形質を短

期間のうちに個体に付与、あるいは増強することが可能である。さらに、外来遺伝子を宿主染色体中に持つ個体同士を計画的に交配することにより、有用形質を持つ系統を比較的短期間のうちに確立することが可能となる。

以上のように、遺伝子導入魚は基礎研究においても水産育種への応用面においても多くの利点を持つ。以下にわれわれが開発した魚類への効率的な遺伝導入法について概説する。

2. マイクロインジェクションによる外来遺伝子の魚類への導入

魚類へ遺伝子を導入するための最も一般的な方法は、受精卵へのマイクロインジェクション法である。すなわち、外来遺伝子を微細なガラスピペット中に充填した後、顕微鏡下でその遺伝子を魚卵へ注入する方法で、今までにも種々の魚種に応用されている²⁾。通常、受精卵の第1卵割以前の(1細胞期の)胚盤(細胞質)に外来遺伝子を注入するが(図

YOSHIZAKI Goro・TAKASHIMA Fumio

1), このステージの魚卵の卵膜は非常に硬く, マイクロピペットを通過させることが困難である。特にサケ科魚類では, この現象が顕著であるため, 従来金属製の針で一度卵膜に穴を開けた後に, ガラスピペットで胚盤へ遺伝子を注入する方法が用いられてきた⁴⁾。

われわれは, ニジマス卵を 1mM の還元型グルタチオン溶液 (pH 8.0) 中で受精させることにより, 卵膜硬化を防ぐことができることを見だし, 非常に容易にマイクロインジェクションが行える方法を開発した^{5,6)}。通常, 約 10^7 コピーの遺伝子を含む 2 nI 程度の DNA 溶液を, 上記の方法で受精卵の細胞質に注入する (図 1)。本法を用いた場合, 対照区とほとんど同様の孵化率が得られ, 注入卵より生じた 50% 前後の個体に外来遺伝子を導入することが可能であった⁷⁾ (図 2)。

ニジマス 1 細胞期の胚盤に注入した外来遺伝子が, 初期発生中にどのように変動するかを図 3 に示した。1 細胞あたりの外来遺伝子の量は胞胚期までに激減した後, 12 日胚まで緩やかに減少し, その後一定のレベルで安定した⁸⁾。この結果は, ほとんどの外来遺伝子は宿主の染色体中に組み込まれることなく分解されるが, 一部の外来遺伝子のみが染色体中に組み込まれ, 胚体形成期以降も安定して存在することを示唆している。さらに, これらの遺伝子は通常数コピーから数百コピーがコンカテマーを形成し, 染色体の 1~数か所に組み込まれる⁷⁾。しかし, 外来遺伝子は細胞内に注入された直後には宿主の染色体中に組み込まれず, 何度かの卵割の後に各細胞で独立して染色体中へ組み込まれるため, 一部の細胞では外来遺伝子を染色体中に持ち, 他の細胞では持たないといったモザイク現象がほぼ 100% の個体で認められた⁹⁾。さらに, 同一個体内でも異なる細胞において独立して外来遺伝子が染色体へ組み込まれることもあるため, 異なる染色体上の異なる位置に外来遺伝子を持つ細胞が混在するという現象も観察されている。以上述べたように, マイクロインジェクション法は熟練を要し, 時間がかかるという欠点があるものの, 現在利用可能

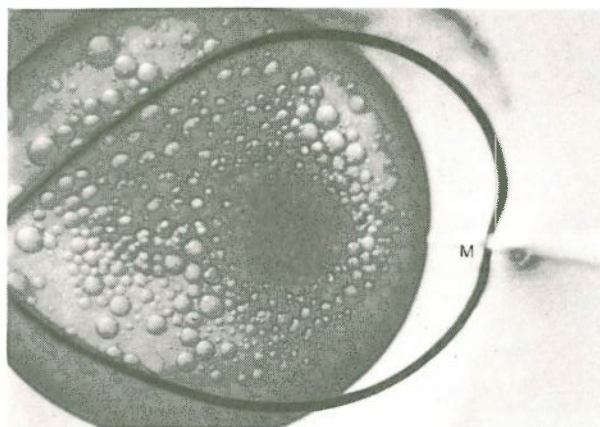


図 1 ニジマス卵への外来遺伝子のマイクロインジェクション
M: マイクロピペット

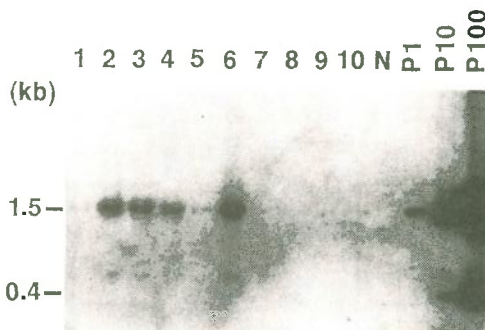


図 2 遺伝子注入ニジマスより抽出した DNA (1-10) を用いて行ったサザンブロット解析

N: 通常ニジマスより抽出した DNA 用いた陰性対照。
P: N にマイクロインジェクションに用いた DNA を混ぜて用いた陽性対照。

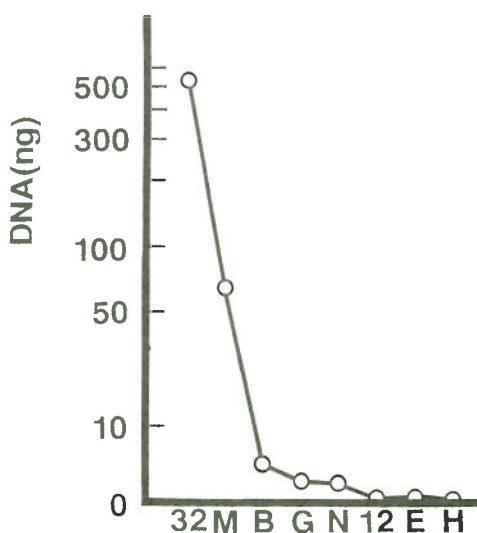


図 3 ニジマスに導入された外来遺伝子の初期発生過程における消長

32: 32細胞期胚, M: 桑実胚, B: 胞胚, G: 囊胚, N: 神経胚, 12: 12日胚, E: 発眼胚, H: 孵化仔魚

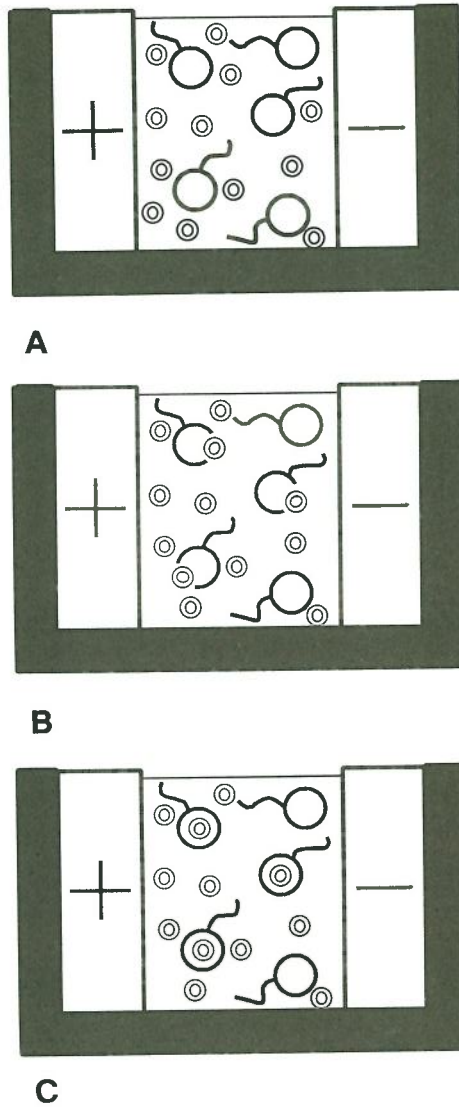


図4 エレクトロポレーション法による
外来遺伝子導入の原理

な技術の中では最も遺伝子導入効率は高く、導入される遺伝子のコピー数も多いため、広く用いられている技術である。

3. エレクトロポレーション法による 魚類の外来遺伝子の導入

エレクトロポレーションとは、細胞とDNAの混合液(図4A)に電気パルスを加えることにより細胞膜を一時的に破壊し、(図4B)、生じた孔から細胞外に存在するDNA分子を細胞内に流入させる方法である。生じた孔はDNAを取り込んだ後修復される(図4C)。本法は元来培養細胞用に開発さ

れた技術であるが、DNA溶液中に懸濁した精子や卵に適用すれば、遺伝子導入魚の作出が可能である。この方法は、大量の卵、精子を容易に処理できるという利点を持つが、一般に遺伝子導入効率がマイクロインジェクション法と比べて低いという問題点がある。すなわち、エレクトロポレーション法では、マイクロインジェクション法のように多コピーの外来遺伝子を細胞内に導入することが困難なため、1細胞あたりに残存する外来遺伝子のコピー数がマイクロインジェクション法のそれより低いと考えられる。さらに、同様の理由によりエレクトロポレーションにより作出された個体は、外来遺伝子を持つ細胞の割合が極端に低いモザイク個体であることが推測される。

最近、われわれは脱水精子を用いたエレクトロポレーション法を開発し、遺伝子導入効率を高めることに成功した¹⁰⁾。まず、搾出した精子を高張処理することにより脱水精子を作出する。得られた脱水精子を等調液中に戻すことにより、精子は外部の環境水を吸収する。したがって、脱水精子を等調のDNA溶液に懸濁し、精子が吸水している最中にパルスを加えることにより、生じた孔よりDNA溶液が大量に精子内に流入することが期待される。コイ精子を用いた実験では精子の受精能に支障を来すことなく、遺伝子導入効率を従来法の約3倍に高めることが可能であった(図5)。

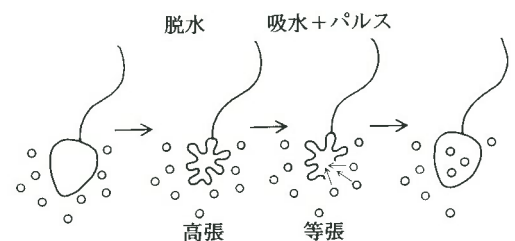


図5 脱水精子へのエレクトロポレーション
による外来遺伝子の導入

3. 外来遺伝子導入のマーカーの開発

上述のように、種々の方法により魚類に外来遺伝子を導入することが可能であるが、外

来遺伝子の導入の有無の確認は非常に大変な作業である。そこで、われわれは簡便な外来遺伝子の検出法を開発するために、ニジマスにシロサケのメラニン凝集ホルモン (MCH) 遺伝子¹¹⁾を導入し、体色の変化による外来遺伝子の導入の確認を試みた。MCH は黒色素胞を凝集させるホルモンであるため、外来遺伝子が発現し、MCH がパラクリンにより細胞外に分泌された場合、その周辺の細胞の黒色素胞が凝集し、体色が明化することが期待される。実際、ラウス肉腫ウイルスの long terminal repeat に MCH 遺伝子を接続した DNA を導入することによって、体色がモザイク状に白化した個体を得ることに成功した (図6)¹²⁾。前に述べたように、外来遺伝子を持つ細胞は多くの場合モザイク状に分布するため、図6のように体色が明化している部分がモザイク状に生じたと考えられる。このような遺伝子の利用により外来遺伝子が発現している個体を肉眼観察のみで確認することも可能であり、今後遺伝子導入法の開発においても、導入効率の指標として応用できると考えられる。

4. まとめ

以上、魚類への遺伝子導入法について紹介したが、遺伝子導入魚の研究は現在急速に発展中である。特に基礎生物学分野でのメダカ、ゼブラフィッシュの利用は年々盛んになっており、それにともない遺伝子導入技術の利用もますます増加すると思われる。一方、水産分野への応用も期待されてるが、今後この技術を有効に各方面に応用していくためには魚類の生理現象を分子レベルで解明するとともに、魚類個体内で有効な種々の遺伝子発現調節配列の開発が急務だといえる。

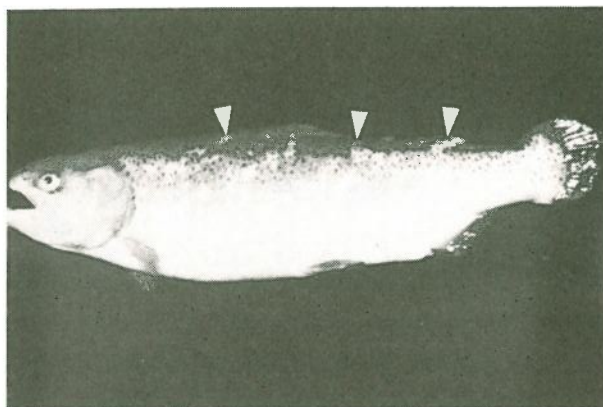


図6 MCH 遺伝子導入ニジマス
矢印は体色が明化した部分

文献

- 1) Isola, L. M. and J. W. Gordon (1991) Transgenic Animals (N. First and F. P. Haseltine ed.) Butterworth-Heinemann, pp. 3-20
- 2) Hackett, P. B. (1993) Molecular Biology Frontiers (P. W. Hochachka and T. P. Mommsen ed.) Elsevier, pp.207-240
- 3) Hew, C. L. *et al.* (1995) *J. Fish Biol.*, 47 (Suppl. A): 1-19
- 4) Chourrout, D. *et al.* (1986) *Aquaculture*, 51: 143-150
- 5) 吉崎悟朗ら (1989) 日水誌, 55: 396
- 6) Yoshizaki, G. *et al.* (1991) *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 819-824
- 7) Yoshizaki, G. *et al.* (1992) *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 1659-1665
- 8) 小林修一ら (1991) 平成3年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p 79
- 9) Yoshizaki, G. *et al.* (1991) *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 2203-2209
- 10) 姜 汀河ら (1996) 平成8年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p 89
- 11) Takayama, Y. *et al.* (1989) *Gene*, 80: 65-73
- 12) 渡辺祐介ら (1993) 平成5年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p 201

地域の先端研究

キクとハマギクとの属間雑種の作出

愛知県農業総合試験場

長谷川 徹

胚珠培養法を用いて、キクと野生ギクの一つであるハマギクとの属間雑種作出を試みた。キクとハマギクを交配し、採取した胚珠を培養した結果、約5,000個の胚珠のうち1個が正常に生育して植物体となった。染色体数調査により、この個体を雑種と確認した。雑種の葉は両親の中間的な形態を示したが、花は両親よりも小型になった。

1. はじめに

キク (*Dendranthema grandiflorum*) は、我が国の花き総生産額の約4分の1を占める重要な品目である。近年、産地間競争の激化や環境問題への関心の高まりから、新規性・商品性に富み、耐病性のある品種の育成が求められている。

ハマギク (*Nipponanthemum nipponicum*, 図1) は、東北地方の太平洋岸に自生する野生ギクの一つである。キクにはみられない、光沢のあるへら型の葉が特徴で、観賞用としても栽培されている。また、キクの重要病害の一つである白さび病に罹病しない。以上の

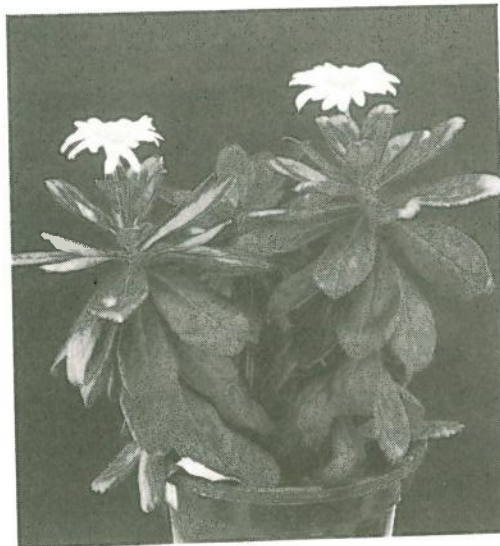


図1 ハマギクの形態

HASEGAWA Toru

点から、従来にない葉型や耐病性を備えた新しいキク品種を育成するための育種素材として、利用価値が高いと考えられる。

キク属の野生ギクとの交雑による品種育成の試みは、イソギク (*D. pacificum*) との種間交雑から新品種を育成した柴田らの例¹⁾などがある。しかし、ハマギクはキクと属が異なり、交雑が不可能であるため、これまで育種に利用することが出来なかった。そこで当場は、胚珠培養法を用いてキクとハマギクとの雑種作出を試みた。

2. 交配および胚珠培養

子房親に雄性不稔の白色花スプレーギク品種「スワン」を用いた。試験区は、交配から胚珠採取までの期間を1,2,3,4,5,6,8,10,12,14日間とした10区と、胚珠培養培地のショ糖濃度を40,60,80,100g/lとした4区とを組み合わせた計40区を設定した。

平成7年5月に、「スワン」とハマギクとの交配を行った。所定期間後に花柱の短縮した管状花を採取し、有効塩素濃度1%のアンチホルミン液で3分間殺菌後、滅菌水で洗浄した。管状花から摘出した胚珠を、所定濃度のショ糖を含む胚珠培養培地 (MS培地, 10g/l 寒天) に置床し、25°C, 500lux, 16時間照明下で4か月間培養した。

供試した4,903個の胚珠のうち、26個が発根や子葉展開等の発育を示した。胚珠採取が交配6日目以降の区では、それ以前の区に比

べて、発育胚珠数が比較的増加する傾向がみられた。ある程度胚の発育ステージの進んだ胚珠を用いる方が、培養は容易になるものと思われる。また、培地のショ糖濃度の影響については現時点では不明であり、今後検討の必要がある(表1)。

表1 交配から胚珠採取までの期間と培地のショ糖濃度が胚珠の発育に及ぼす影響

胚珠採取までの期間(日)	40g/l		60g/l		80g/l		100g/l	
	A ¹⁾	B ²⁾	A	B	A	B	A	B
1	186	0	186	0	187	0	186	0
2	140	0	140	0	140	0	140	0
3	156	1	155	0	156	0	157	0
4	124	0	127	1	125	0	127	0
5	141	0	141	0	140	0	141	0
6	89	0	92	2	86	1	90	1
8	90	1	89	0	90	0	89	2
10	104	2	105	0	104	1	104	1
12	88	2	88	1	87	2	88	1
14	107	2	106	2	106	1	106	2

注 1) A:置床胚珠数 2) B:発育胚珠数

3. 発育胚珠からの植物体育成

胚珠の発育の種類は、A:発根のみ、B:子葉展開のみ、C:発根と子葉展開、D:発根と本葉展開の4タイプに分類できた。これらの胚珠を、育成培地(無機成分1/2のMS培地、30g/lショ糖、10g/l寒天)に移植し、25°C、5,000lux、16時間照明下で1か月間培養した。その結果、A、B、Cタイプの胚珠は全て途中で生育停止したが、Dタイプの3個の胚珠(No.4, 12, 15)は正常に生育して植物体となった(表2、図2)。

この3個体を、継代培地(MS培地、30g/lショ糖、10g/l寒天)に移植して培養した

表2 胚珠の発育の種類と植物体形成

発育の種類	発育胚珠数 ¹⁾	植物体形成胚珠数 ²⁾
発根のみ	17	0
子葉展開のみ	1	0
発根と子葉展開	5	0
発根と本葉展開	3	3

- 1) 胚珠培養終了時
- 2) 育成培養終了時



図2 胚珠から発育した3個体
左: No.4 中央: No.12 右: No.15

結果、No.4およびNo.12は茎長が1cmまで生長した段階で生育停止したが、No.15は順調に生育を続け、順化・鉢上げの後、平成8年3月に開花した(図3)。



図3 開花したキク品種‘スワン’とハマギクとの雑種(No.15)

4. 雑種の確認

No.15の根端を材料に用い、酢酸オルセインで染色して観察した結果、染色体数は36本であった。これは子房親の‘スワン’(2n=



図4 雑種(No.15)と両親との染色体数の比較

左: ‘スワン’(2n=54), 中央: 雑種(2n=36), 右: ハマギク(2n=18)

54) と花粉親のハマギク ($2n=18$) のちょうど中間の数であることから、雑種と確認した(図4)。

5. 雑種の形態

雑種の葉身には切れ込みがみられたが、‘スワン’よりは浅く、葉身と葉柄の境界は‘スワン’ほど明瞭ではなかった。葉の縦横比および裏面の毛茸数は、両親の中間であった(表紙)。花色は両親と同じ白色であったが、舌状花弁が短いため花径は両親よりも小さくなった(表紙)。また、雑種は完全な雄性不稔であった。

6. おわりに

以上のように、胚珠培養法を用いることで、キクとハマギクとの雑種を作出することがで

きた。しかし、雑種の得られる確率は非常に低く、用いる胚珠の発育ステージや培地組成等に改良の余地が多い。現在、当試験場の生物工学部と花き研究所との共同で、他の花色のキク品種とハマギクとの雑種作出、作出した雑種ギクの白さび病抵抗性の確認、さらに、雑種を交配親とした新たな交配・選抜を開始しており、ハマギクの形質を導入した新しいキク品種の育成を目指している。

本研究の内容は、平成8年9月に日本育種学会第90回講演会において発表されたものである²⁾。

文献

- 1) 柴田道夫ら(1988) 野菜・茶業試験場研究報告, A2: 257-277
- 2) 長谷川徹ら(1996) 育種学雑誌, 46(別2): 231



ミトコンドリア DNA D-LOOP 領域の PCR-RFLP 分析によるマダイの集団解析¹⁾

兵庫県立水産試験場
田畑和男

西日本の4海域で漁獲されたマダイ集団の遺伝変異レベルを mtDNA D-loop 領域の制限酵素断片長変異の分析によって求めた。変異の大きさの比較は、ハプロタイプ多様度および塩基置換率を各集団について求めることによりおこなった。集団内の変異は大きかったが、集団間の変異の差は小さかった。ハプロタイプ頻度の差をもとにした集団間の異質性については全体間の差は認められなかったが、一部の海域間には有意差が認められた。

マダイは北半球では日本沿岸海域および東シナ海に分布しており、沿岸漁業の重要魚種の一つである。本種の自然界における系群構造は、おもに、標識放流によって研究されてきた。たとえば、瀬戸内海東部においては、瀬戸内海東部系群、紀伊水道外域群が区別されており、また、瀬戸内海中西部においては、豊後水道からの入り込み群と居のこり群の混合系群が識別されている。ところが、アイソザイムによる研究結果からは、日本沿岸海域のマダイは明確に区別がつかず、現在のところ、1系群であるとされている。

また、1980年頃からは、各県の栽培漁業センターにより稚魚放流がなされており、種が多様性が論議されなかった最近までは天然魚群における遺伝的組成と異なった魚群が放流されていたこともあって²⁾、人の手の加わっていない魚種とは異なる問題も包含している。

兵庫水試では1994年から、アイソザイム分析よりも感度が高いとされているミトコンドリア DNA(mtDNA) 分析によってマダイの集団解析を試みているので、以下にその概略を述べる。

マダイの天然集団の遺伝的変異量の把握および集団間の比較を mtDNA の D-Loop 領域の変異を検出、比較することによっておこなった。mtDNA はそれぞれの生物において

独立に変異を受けていると考えられており、その進化速度は核DNAの5-10倍といわれている。また、母系遺伝をすることが知られており、いろいろな種の集団遺伝学的研究に使われている。図1に mtDNA の模式図を示した。以前は mtDNA の全領域を対象にした研究が多かったが^{3,4)}、最近では PCR で D-Loop 等の特定領域を増幅する手法が使われることが多い⁵⁻⁷⁾。

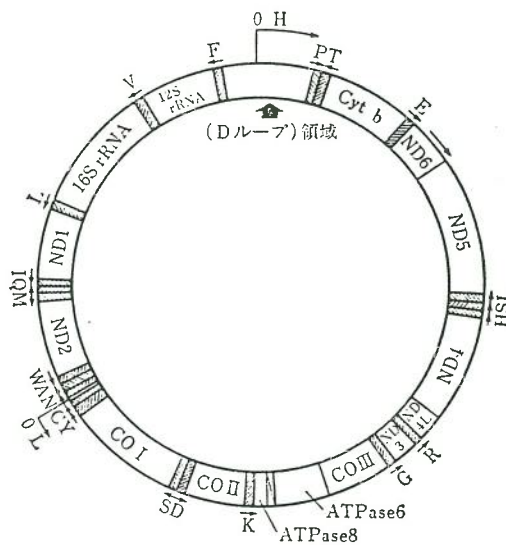


図1 ミトコンドリア DNA の模式図 (宝来, 1992)

マダイ(当歳魚)のサンプリングは、図2に示す西日本の4海域から1994年と1995年の秋にそれぞれ1回づつおこなった：友ヶ島水道(兵庫県洲本市沖)、田辺湾(和歌山県田辺市沖)、備後灘(広島県尾道市沖)、日本海



図2 供試マダイのサンプリング海域

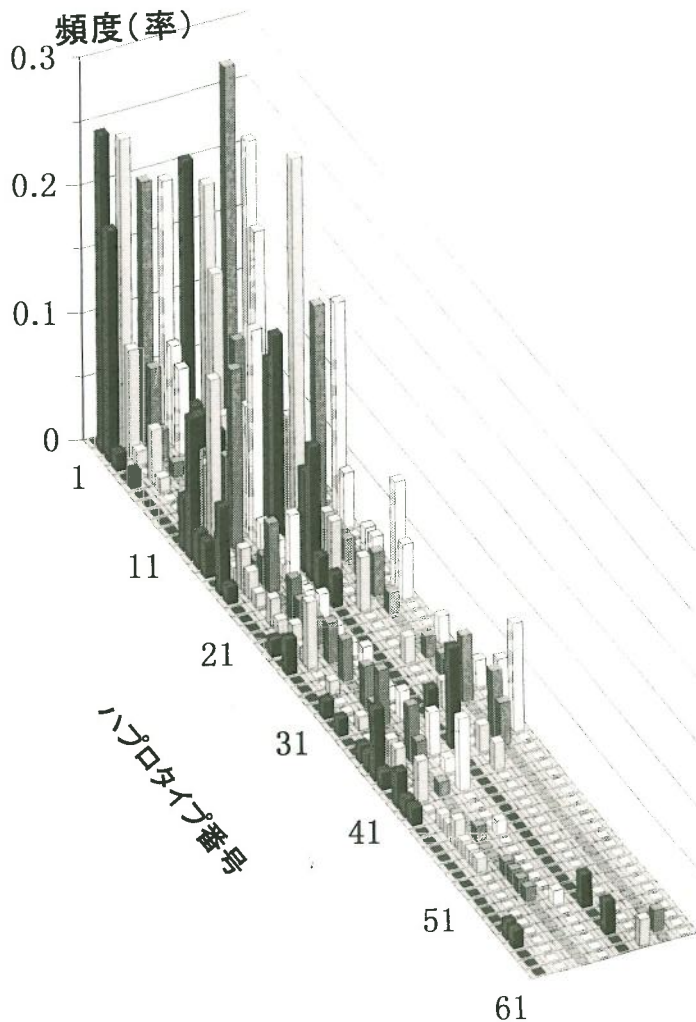


図3 1994年および1995年における4海域のマダイサンプルから出現したハプロタイプとその頻度(率)

左から1995年の田辺湾、友ヶ島水道、日本海、備後灘、つづいて1994年の田辺湾、友ヶ島水道、日本海、備後灘。

95%出現確率は、例えば1995年の田辺湾のサンプルでは、表1から0.041であるので、それ以上の頻度(率)を持つハプロタイプはNo.2, 3, 13, 14, 18, 39の6ハプロタイプである。

(兵庫県竹野町沖)。ところで人工生産種苗には鼻腔隔皮の欠損や胸鰭の変形が往々にしてみられる。今回のサンプルでは、田辺湾の1995年群には鼻腔隔皮欠損率が19%、胸鰭変形率が34.5%であった。その他のサンプルは0から5%の範囲内であった。これらの変形が観察された個体は今回の分析から除外したが、なおも漁獲群のなかには、いくらかの割合で人工生産種苗が含まれているものと思われる。

DNAの抽出は、凍結魚の体側部筋肉の50-100mgをTNE buffer中で一夜Proteinase-K処理したのち、Phenol-chloroformによりおこなった。この全DNAを用いてPCRにより、mt-DNAのD-Loop領域を増幅した。図1に示すように増幅対象DNAはD-Loop領域を含んだ領域で、Cyt b遺伝子領域から12S rRNA領域にまたがっており、塩基数は約2,100bpである⁵⁾。

RFLP(制限酵素断片長多型)は、5種類の4塩基認識酵素(*Hae* III, *Hha* I, *Msp* I, *Taq* I および *Rsa* I)と1種類の5塩基認識酵素(*Hinf* I)を用い、Polyacrylamideゲル電気泳動法により検出した。

制限酵素の切断型は、それぞれ*Hae* IIIが3, *Hha* Iが1, *Hinf* Iが5, *Msp* Iが3, *Taq* Iが11, および *Rsa* Iが15であった。ハプロタイプ(各酵素ごとの切断型の組み合わせ)数の理論的出現数は $3 \times 1 \times 5 \times 3 \times 11 \times 15 = 7,425$ であるが、今回出現したハプロタイプの総数は61であった(図3)。

1994年および1995年の4つの海域で調査したマダイサンプルにおいて、どのハプロタイプがどの程度の頻度で出現したかを図3に示した。この結果から、各調査海域におけるマダイの集団の多様性の尺度の一つであるハプロタイプ多様度を計算し、表1に示した。この値は0から1の間に分布し、1が最大の多様性を示し、0の場合は多様性が全くないことを示す。マダイの各集団におけるハプロタイプ多様度は、平均では0.89、範囲では0.882~0.920と高い値を示した。

ところで、出現するハプロタイプ数はサンプル数に依存している。今回のように理論的ハプロタイプ数が多いと、いったい調査すべきサンプル数はいくらかのかという疑問がわいてくる。Grewe et al. (1993)⁶⁾は、このことに関して次のような答えを出している。ラ

表1 天然および放流用マダイ集団におけるハプロタイプの出現数, 多様度, および95%確率の出現頻度¹⁾

1995年天然産マダイ					
ハプロタイプ no.	田辺湾95	友ヶ島水道95	日本海95	備後灘95	計 or 平均
サンプル数	72	95	93	90	350
ハプロタイプ出現数	23	31	28	24	26.5
ハプロタイプ多様度	0.883	0.905	0.920	0.905	0.903
95%確率の出現頻度	0.041	0.031	0.032	0.033	
1994年天然産マダイ					
ハプロタイプ no.	田辺湾95	友ヶ島水道95	日本海95	備後灘95	計 or 平均
サンプル数	38	48	58	47	191
ハプロタイプ出現数	15	16	22	16	17.3
ハプロタイプ多様度	0.895	0.857	0.882	0.889	0.881
95%確率の出現頻度	0.076	0.061	0.050	0.062	

注) ここで示された値以上の出現頻度を示したハプロタイプは, 今回のサンプリングがランダムに行われたとして, 95%の確率で存在していると考えられる (図3参照)。

ンダムに選ばれた n 個体のなかで, 出現頻度が p であるハプロタイプを持つ個体を少なくとも 1 個体観察できる確率 (β) は, $\beta = 1 - (1-p)^n$ で計算でき, これから $n = \ln(1-\beta) / \ln(1-p)$ が導かれる。今回調査した海域におけるマダイのサンプル数から $\beta = 0.95$ のもとで p を計算し, その結果を表 1 に示した。この p の値以上の出現頻度を示したハプロタイプが, 95%の確率で意味を持つものと考えられる。この確率を超えるハプロタイプ数は, サンプルが多いほど多くなる (データの信頼性が高くなる)。すなわち, 図 3 に示したように, 1994年では, ハプロタイプ頻度 (率) の高いほうから 4 ないし 5 番目のあたりが, 95%の確率で少なくとも 1 個体観察できることとなる。一方, サンプル数の多い 1995年では, この確率を超えるハプロタイプの数が増え, 高いほうから 6 ないし 10 番目までであった。

さて, 調査したマダイ集団のハプロタイプ頻度をもとにして, 集団を区別できるかどうかという問題を考える。低頻度のハプロタイプが多数出現する場合, 通常の方法で chi-square test をおこなうにしても dominant か sub-dominant なハプロタイプのみを対象にした評価しか得ることができない。こういった場合は, すべてのハプロタイプを対象にできる Monte Carlo 法⁹⁾により検討するのが賢明である。結果は表 2 に示した。全体間

および個々の組み合わせのほとんどの間で有意差はなかった。 $p < 0.01$ で有意であったのは, 1995年の田辺湾に対して1994, 1995年の備後灘と, 1994年と1995年の備後灘間の 3 サンプル間のみであった。1995年の田辺湾サンプルは鼻孔隔皮欠損等によって推定した放流種苗の混入率が高率であった。放流種苗をのぞいて計算したとはいえ, 除外しきれなかったサンプルも相当数残っていることも考えられ, 本来の天然集団の遺伝的組成とはかなり異なっている可能性がある。備後灘については両年の間に大きな差があり, この海域の遺伝組成における不安定さを示しているように思われる。

つぎに, 集団の多様性を表現する方法として, 塩基多様度という尺度があるのでこのことについて以下に述べる。まず, サイトあたりの塩基置換数を制限酵素断片データから求めて DNA の塩基置換率を計算する。この値をもとに集団 X または集団 Y, および集団 X, Y における 2 つのハプロタイプ間の塩基置換率の平均値 (それぞれ d_x, d_y, d_{xy}) を計算し, これらの値から 2 集団間 (X, Y) の純塩基置換率 d_A を次式からもとめる¹⁰⁾。

$$d_A = d_{xy} - (d_x + d_y) / 2$$

結果を表 3 に示した。各集団内の塩基置換率はかなり高い値を示した。また, 各集団間のみかけの塩基置換率はかなり高い値を示したが, いっぽう, 純塩基置換率は 0.01-0.04

表 2 マダイ集団間のハプロタイプ頻度の差の検定 (モンテカルロ法)¹⁾

	田辺湾95	友ヶ島水道95	日本海95	備後灘95	田辺湾94	友ヶ島水道94	日本海94	備後灘94
田辺湾95								
友ヶ島水道95								
日本海95								
備後灘95								
田辺湾94								
友ヶ島水道94								
日本海94								
備後灘94								

対角線より上部は検定結果を図で示す

: $p < 0.01$,
 : $0.01 < p < 0.05$,
 : $0.05 < p$

表 3 天然および放流用マダイの集団間の塩基置換率 (%)¹⁾

	田辺湾95	友ヶ島水道95	日本海95	備後灘95	田辺湾94	友ヶ島水道94	日本海94	備後灘94
田辺湾95	0.936	1.003	0.999	1.014	1.002	0.887	0.958	1.000
友ヶ島水道95	0.015	1.039	1.033	1.044	1.022	0.931	1.022	1.044
日本海95	0.022	0.005	1.017	1.033	1.009	0.921	1.000	1.036
備後灘95	0.026	0.005	0.005	1.039	1.017	0.935	1.020	1.055
田辺湾94	0.048	0.017	0.015	0.012	0.971	0.904	1.005	1.035
友ヶ島水道94	0.018	0.010	0.012	0.014	0.018	0.801	0.903	0.944
日本海94	0.012	0.024	0.013	0.022	0.041	0.024	0.957	1.002
備後灘94	0.023	0.016	0.019	0.027	0.041	0.034	0.015	1.018

対角線より上部は、集団間の塩基置換率

対角線上は、集団内塩基置換率

対角線より下部は、集団間の純塩基置換率

%程度と低かった。

以上のことから、今回調査したマダイ集団は集団内に高い変異性を持っていることが明らかになった。しかし、日本海域を含めて海域群間の差は基本的には顕著ではなかった。ただし、何らかの原因で有意となる海域間もあることがわかった。この原因は放流種苗による可能性もあるものと思われる。今後、これらのことをさらに明確にするために、各地の放流用種苗とマダイの主産地の一つである九州の西部海域や愛媛県海域、さらに東シナ海、南半球へとサンプリングを拡げ現在分析中である。

本研究は(辻)日本水産資源保護協会の委託研究によって行われた。

文 献

1) Tabata K. and A. Mizuta (1997) *Fish-*

eries Science, 63, 印刷中

- 2) 田畑和男 (1994) 水産増殖, 42: 85-91
- 3) Ovenden, J. R. (1990) *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 41: 835-853
- 4) Billington, N. and P. D. N. Hebert (1991) *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48 (Suppl. 1): 80-94
- 5) Martin, A. P. et al. (1992) *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 2386-2391
- 6) Cronin, M. A. et al. (1993) *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 708-715
- 7) 高橋保夫・小林敬典・上田高嘉 (1994) 水産育種, 20: 39-45
- 8) Grewe, P. M. et al. (1993) *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 2397-2403
- 9) Roff, D. A. and P. Bentzen (1989) *Mol. Biol. Evol.*, 6: 539-545
- 10) 根井正利 (1990) 分子進化遺伝学, 培風館, pp. 433

文献情報

新技術による B 型肝炎ウイルスに対するワクチン作製へのアプローチ

B型肝炎ウイルス (human hepatitis B virus; HBV) に感染した場合、90%以上の人はウイルスの表面抗原に対する抗体などの働きで自然に治癒し、劇症に至る場合は僅かである。しかしながら、現在最大の問題となっているのは、慢性的に感染している伝染源としてのキャリアー人口が世界で300万人にも達することであり、対策として、ワクチンの利用が急がれている。HBVの表面抗原タンパクHBsAgに対して作られる抗体は、HBVの亜種に依らず共通に反応するため、その抗原決定基はワクチン抗原として利用できることが推測される。ここでは、抗原決定基の解析を基礎に、合成ワクチンの作成の可能性および形質転換植物作出によるワクチン生産の可能性を示した研究事例について解説する。

免疫グロブリン immunoglobulin タンパクおよびT細胞 T cell の抗原受容体上に存在する抗原結合部位はそれぞれの抗原に特異的な構造をとるため、それ自体特有の抗原性 (イディオタイプ idio type) を持つ。Jerne, N. K. (*Ann. Immunol. (Paris)*, 125C: 373-389, 1974) が提唱したイディオタイプ・ネットワーク説 idio type network theory は、各イディオタイプに対する抗体 (抗イディオタイプ抗体 anti-idio typic antibody) がイディオタイプを示す抗体産生細胞の応答の調節を行っていることを示しているが、このことから、抗イディオタイプ抗体の可変部 variable region は抗原上の抗原決定基の機能的な模倣体 mimicry でありうるということが推測される。そこで、HBVの抗原決定基を解析するために、抗イディオタイプモノクローナル抗体 (2F10) を抗原として免疫したマウスの免疫学的性状を調べた。そのマウスのリンパ節由来T細胞は、抗原である2F10のみならず、HBsAgにも応答することが判明し、2F10上の抗原決定基はHBsAgの抗原

決定基と機能的に類似していることが確認された。このモノクローナル抗体2F10の可変部をコードする遺伝子を定法の mRNA シーケンス法で決定し、アミノ酸配列を推定したところ、H鎖 heavy chain の可変部に、既報のHBsAgアミノ酸配列と高い相同性を示す領域 (15アミノ酸) が見いだされた。

この15アミノ酸よりなるペプチドを合成し、HBV感作マウスに投与すると、抗HBsAg抗体の産生を刺激することが確認された。一方、このペプチドを抗原として免疫したマウスのT細胞は、ペプチドおよびモノクローナル抗体2F10に応答し、興味深いことに、HBsAgで刺激をすると明らかに応答が高まることが示された。以上の結果は、この合成ペプチドがHBVの表面抗原の模倣体としてワクチンに利用できる可能性を示唆している。

一方、冷蔵システムや健康管理のシステムが構築されていない地域に用いるために、経口で、より低いコストで、簡単に利用できるワクチンの開発が期待されている。Mason, H. S. *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 11745-11749, 1992) は、タバコにHBsAgタンパクをコードする遺伝子を導入し、形質転換体でタンパクの産生を確認しているが、今回、そのタバコの葉を投与して免疫したマウスが確かにHBVの抗原決定基を認識している抗体を作っていることが明らかになった。このことから、タバコの葉の細胞で発現しているHBsAgは、免疫学的にアクティブであり、今後はこれを利用して植物ベースの「食べられるワクチン (edible vaccine)」研究を推進する予定である。

(抄訳 有江 力一理研)

(ARIE Tsutomu)

Novel approaches to vaccine development against HBV

Thanavala, Y.

Journal of Biotechnology, 44: 67-73(1996)

文献情報

着床前マウス胚の分化に対応するタンパク質

受精後の初期胚は分割をくり返し、特徴のある形態変化を経て分化し、個体へと発生していく。哺乳動物の着床前初期胚は、細胞間の結合が強くなり緊密になるコンパクション期；腔を形成する胚盤胞期を経て、透明帯を脱出し子宮に着床する。初期胚は、まずコンパクション期で極性が生じ、さらに胚盤胞期では、内部細胞塊と栄養外胚葉が出現し、これが実質的な分化の始まりである。内部細胞塊は胎子等に分化し、栄養外胚葉は胎盤等に分化する。しかし、こうした極性や分化のメカニズムについてはよくわかっていない。

Louvetらは、エズリンがマウス着床前初期胚の分化に関与していることを報告した。エズリンは、分子量 84 kDa で、アクチンフィラメント-細胞膜貫通タンパク質のクロスリンカーとして機能し、アクチンフィラメントを細胞膜へ結び付ける。また、微絨毛の構造形成に利用されている。

エズリンの mRNA とタンパク質は、卵母細胞にすでに存在しており、胚盤胞期までの着床前の発生を通して存在していた。しかしエズリンの量は、発生の進行にともない減少し、胚盤胞期では1細胞期の約半分であった。マウス胚は8細胞期でコンパクションが起きるが、エズリンの減少はコンパクション後に顕著であった。またチロシン残基がリン酸化されている、等電点の異なる2種類のエズリンは、着床前の胚発生を通して存在していたが、8細胞期ではチロシン残基がリン酸化されていないエズリンが出現した。この3番目のエズリンは、8細胞期から胚盤胞期にかけて増加していた。

マウス初期胚におけるエズリンの局在も特徴的であった。エズリンは、2細胞期から8細胞期のコンパクション以前では割球が互いに接触している部分を含む表層に存在するが、コンパクション後は外側の微絨毛のみに制限

され、それ以降は外側の表面部に局在する。つまり、8細胞期から16細胞期の移行期にかけては微絨毛に結合しているが、それ以降では外側の細胞にのみ局在する。すなわち、エズリンは細胞質の表層に最初に局在するタンパク質であり、分割が対称的でなくなる16細胞期の胚では外側表面のみに局在する。3番目のエズリンは極性の生じる8細胞期に出現している。このことは、エズリンがコンパクション時に微絨毛を安定化させることを示しているのだろう。一方、エズリンがコンパクション時に顕著に減少したのは、微絨毛の消失を容易にするためと考えられる。

この研究では、エズリンが初期発生と分化に密接に関与していることを示している。哺乳動物の着床前初期胚の発生は、受精後に雌雄前核の融合、タンパク質の卵母細胞由来から胚性由来への移行、極性の生じるコンパクション期、胚盤胞期での分化と、形態的、機能的にダイナミックな変化をとまなう。分化に対応するタンパク質や糖の検出は、極性や分化のメカニズムの解明、ES細胞株の樹立における多能性分化能を有する細胞の分離等に役立つだろう。

(抄訳 松本浩道—東北大農)

(MATSUMOTO Hiromichi)

Ezrin becomes restricted to outer cells following asymmetrical division in preimplantation mouse embryo

Louvet, S., J. Aghion, A. Santa-Maria, P. Mangeat, B. Maro

Dev. Biol., 177 : 568-579, (1996)

文献情報

各系統プリオンタンパク質の分子解析と新種のクロイツフェルト・ヤコブ病の病因について

最近ではO-157の陰にかくれてあまり話題にならなくなってしまったが、狂牛病は1996年のトピックスのひとつであったと思う。この話題に関する世間の関心は、この狂牛病が人に感染するか否かという点に絞られるのではないだろうか。この件に関する興味深い報

告を紹介したい。

John Collinge らは狂牛病、クロイツフェルト・ヤコブ病（以下CJD）などのプリオン病の原因であると考えられているプリオンタンパク質に注目し、各種CJD患者のプリオンタンパク質をウエスタン・ブロットで解析した。彼等は病態型プリオンタンパク質のプロテアーゼ耐性を利用して、プロテイナーゼKで処理した患者の脳組織抽出液についてモノクローナル抗体3F4を用いたウエスタン・ブロットを行った。その結果、各患者のプリオンタンパク質は4タイプのパターンに分類された。

プリオンタンパク質には糖鎖が1本付いたもの、2本付いたものおよび全く付いていないものがあるため、ウエスタンブロットイングを行った場合に分子量の異なる3本のバンドが出現した。タイプ1、2および3はよく似たパターンを示したが、タイプ1より2、2より3と各バンドが低分子側にシフトした。各タイプの3本のバンドは太さが異なり、糖鎖が1本付いた2番目のバンドが最も太く、糖鎖が2本付いた高分子側のバンドが最も細い。これに対してタイプ4は、各バンドの移動度に関してはタイプ2とほぼ同じであったが、糖鎖が2本付いた高分子のバンドのみが著しく太い特異なパターンを示した。

このプリオンタンパク質の4種類のタイプはCJDの種類と関係がある。CJDには散发性の（いわゆる一般的な）CJD、ヒト由来の成長ホルモンの投与などに起因する医原性のもの、および最近イギリスで発生している新種の（若年性の）ものが知られている。これらのうち散发性のCJD患者のプリオンタンパクは26例中、21例がタイプ2そして5例がタイプ1のパターンであった。また、医原性の患者の場合そのパターンはほとんどがタイプ3で、タイプ1および2は7例中に各1例ずつしかなかった。これに対して新種のCJD患者の場合10例全てがタイプ4のパターンを示した。

ところで、狂牛病のプリオンタンパク質はどのパターンになるかというと、タイプ4で

あった。このことから、最近イギリスで発生している新種のCJDと狂牛病との深い関連性が考えられるが、彼等はウシからヒトへの感染に関して否定的なデータも示している。

ヒト・プリオンタンパクを発現させたトランスジェニック・マウス（マウス・プリオンタンパク質は発現していない）を用いた感染試験の場合、ヒトのタイプ1、2および3のプリオンタンパク質は短期間のうちにマウス脳中にプロテアーゼ耐性を持った病態型ヒト・プリオンタンパク質を発現させた。しかし、野生型のマウスに感染性のある狂牛病プリオンタンパク質はこのトランスジェニック・マウスには感染しなかった（正確には、接種後500日以上たっても感染の兆候は認められなかった）。

この実験からは狂牛病プリオンタンパク質はヒト・プリオンタンパク質を病態型に変換することができないという結論が導かれる。しかし彼等は同時に次のような報告も行っている。

狂牛病のプリオンタンパク質を実験的にサルに接種した場合感染は成立し、タイプ4に極めてよく似た病態型プリオンが生じた。またさらに、自然発生したネコの狂牛病でもそのプリオンタンパク質はタイプ4によく似ていた。

結局、白黒ははっきりせず灰色のままであるが、ヒトのタイプ4プリオンタンパク質を用いた感染試験などは早急に行う必要があるのではないだろうか。この狂牛病の問題は感染試験など長期間にわたった実験を必要とする研究であるが、一日も早く決着が着くことを期待したい。

（抄訳 中島 浩—マルハ中研）

(NAKAJIMA Hiroshi)

Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD

Collinge, J. *et al.*

Nature, 383 : 685-690 (1996)

文献情報

酵母細胞壁タンパクが GPI
グリカンを介してグルカン
と結合している証拠

酵母細胞壁は酵母と外界との接点である。醸造関係では凝集性や泡への付着能力等の細胞表層の性質にも深く関与していると思われる。また増殖や生殖の際には酵母本体に同調して細胞壁を構築する必要がありその制御も興味深い。しかし細胞壁は酵母固有の構造物であり、“モデル生物”酵母の研究者には関心外であった。構造の詳細・構築機構でさえ明らかになっていない部分も多く、酵母の器官としては「最大の未知領域」ともいえよう。

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞壁は主として β 1,6-グルカンと β 1,3-グルカンのヘテロポリマーおよびマンノプロテイン、少量のキチンからなっている。細胞壁タンパクには、

- 1) 単に細胞壁にトラップされているもの、
 - 2) 細胞壁グルカンと共有結合しているもの、
- の2種類がある。1)のタンパクは SDS 等で抽出できるが、2)のものはグルカナーゼで細胞壁グルカンを消化しないと抽出できない。2)のタイプの主なタンパクが同定されたのはここ1、2年のことであり、現在までに5種類が報告されている。

この共有結合型のタンパクはいずれも glycosyl phosphatidylinositol(GPI) anchor のシグナルを持っている。これらのタンパクは GPI で膜にアンカリングされた後細胞壁グルカンに転移すると考えられるが、その機構やグルカンとの結合様式は不明である。最も有力な仮説は H. de Nobel らの提唱したもの (*Trends in cell Biol.*, 4: 42-45, 1994) で、C 末端にある GPI anchor のグリカン部分を利用してグルカンに結合している、というものである。しかしそれを直接証明するような証拠は報告されていなかった。

Kapteyn らは、細胞壁のグルカナーゼ抽出物を SDS-PAGE で分離し4種の抗体(細胞壁タンパクの抗体2つ、 β 1,3-グルカンの抗体・ β 1,6-グルカンの抗体)を駆使して解析した。 β 1,3-グルカナーゼを用いて抽出した細胞壁タンパクは「消化された β 1,3-グル

カンの破片」をタンパクにつけたまま抽出される。実際抽出タンパクからは β 1,6-グルカンとともに β 1,3-グルカンが検出された。しかし抽出タンパクを β 1,6-グルカナーゼで再消化したものからは β 1,3-グルカンは検出されず、 β 1,6-グルカンのみが検出された。この結果は細胞壁タンパクが β 1,6-グルカンを介して β 1,3-グルカンと結合していることを示している。

さらに Kapteyn らは、上記の細胞壁タンパクに対しホスホジエステル結合を切るような化学処理(HF処理)や酵素処理(ホスホジエステラーゼ処理)を行った。この処理を行った細胞壁タンパクからは β 1,3-グルカンおよび β 1,6-グルカンが検出されなくなった。一方、酵素処理時に阻害剤を加えるとグルカンは検出されている。この結果はタンパクとグルカンはホスホジエステル結合を介して結合していることを示している。そしてこのホスホジエステル結合は GPI のものと考えられる。

これらの結果は、今まで得られている状況証拠(細胞壁タンパクのC末端領域を削ると細胞壁タンパクは分泌される、細胞壁タンパクのC末端領域があれば分泌タンパクを細胞壁に固定できる)よりもより直接に GPI グリカンの関与を示すものである。残念ながら① GPI のホスホジエステル結合であることを証明していない、② グルカンの抗体が何個以上のポリマーを認識できるのかという点が不明、なものの細胞壁の構造を探るためには一歩前進といえる。またこの構造が細胞膜から壁への転移酵素によってできたであろうことを考えあわせると、タンパクを不溶性のグルカンに固定化するその酵素やメカニズムは新技術を産み出す可能性を秘めているようにも思える。

(抄訳 藤井 力一 国税庁醸造研究所)

(FUJII Tsutomu)

Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β 1,3-/ β 1,6- glucan hetero-polymer

Kapteyn, J. C., R. C. Montijn, E. Vink, J. de la Cruz, A. Llobell, J. E. Douwes, H. Shimoi, P. N. Lipke and F. M. Klis
Glycobiol., 6: 337-345 (1996)

海外便り

細胞内小胞輸送における 膜タンパク質の機能解析

—Memorial Sloan-Kettering Cancer Center での2年—

農林水産省 食品総合研究所

町田幸子

1. はじめに

細胞内輸送経路におけるタンパク質輸送は、コンパートメント間を行き来する小胞によって媒介されている。この細胞内の小胞輸送は、供与体膜からの小胞の形成と出芽、標的となるコンパートメントへのターゲティング、そして受容体膜への融合の過程から成り立っている。本機構は生化学、細胞生物学における重要で興味深いテーマであり、精力的な研究が多くの研究者によって進められている。

筆者は、1994年8月より2年間、オールギャランティ在外研究員として、ニューヨーク市、Memorial Sloan-Kettering Cancer Center の Rothman 博士のもとで、この細胞内小胞輸送に関する研究に従事する機会を得た。周辺の研究の進展を、特に筆者が実際に関わった融合過程の解析に焦点を当て、紹介させて頂きたい。

2. SNARE 仮説まで

1980年代前半、2つの画期的な研究手法の開発により、分子レベルでの小胞輸送の研究は飛躍的な進展をみせた。その一つが Schekman のグループによるタンパク質分泌に異常のある酵母温度感受性変異株 (sec 変異株) の単離であり、他方が、筆者が在外研究に従事した Rothman のグループによる無細胞系によるゴルジ体内タンパク質輸送系の試験管内再構成である。

引き続き Rothman らは、CHO 細胞のゴ

ルジ膜による小胞輸送の再構成系を用いることにより、小胞の融合の過程に必要な N-ethylmaleimide (NEM) 感受性の因子: NSF (NEM sensitive fusion protein) を、そして NSF のゴルジ膜への結合に必要な可溶性のタンパク質因子として α -, β -, γ - の3種類の SNAP (soluble NSF attachment proteins) を分離精製し、また、SNAREs (SNAP receptors) と名付けられた膜内在性の因子の必要性も明らかにした。さらに1993年、ウシ脳より小胞膜上の SNAREs として VAMP/synaptobrevin が、受容体膜上の SNAREs として syntaxin/HPC1 および SNAP25 (分子量 25 kDa の synaptosome-associated protein, soluble NSF attachment protein の略称 SNAP とは無関係) が同定され、前者を v-SNARE, 後者を t-SNARE と名付けた SNARE 仮説が提唱された。この仮説は融合の過程を図1に示したモデルによって説明している。

1) まず融合の初期の段階として SNAREs が活性化される, 2) 活性化された v-SNARE は自身と結合すべき t-SNARE を認識し v-SNARE/t-SNARE 複合体を形成する, 3) 次のステップとして SNAPs の存在下に NSF が v-SNARE/t-SNARE 複合体に結合し 20S の融合装置を形成し、輸送小胞膜と受容体膜の融合の過程へと入って行く, 4) 最終段階では NSF の ATPase 活性により ATP が加水分解されることにより 20S complex のコンフォメーション変化が引き起こされ最終的な膜融合が引き起こされる。

筆者の到着当時、既にこの SNARE 仮説が提唱されてから1年が経過し、この仮説を巡って様々な角度からの研究が世界各地の研

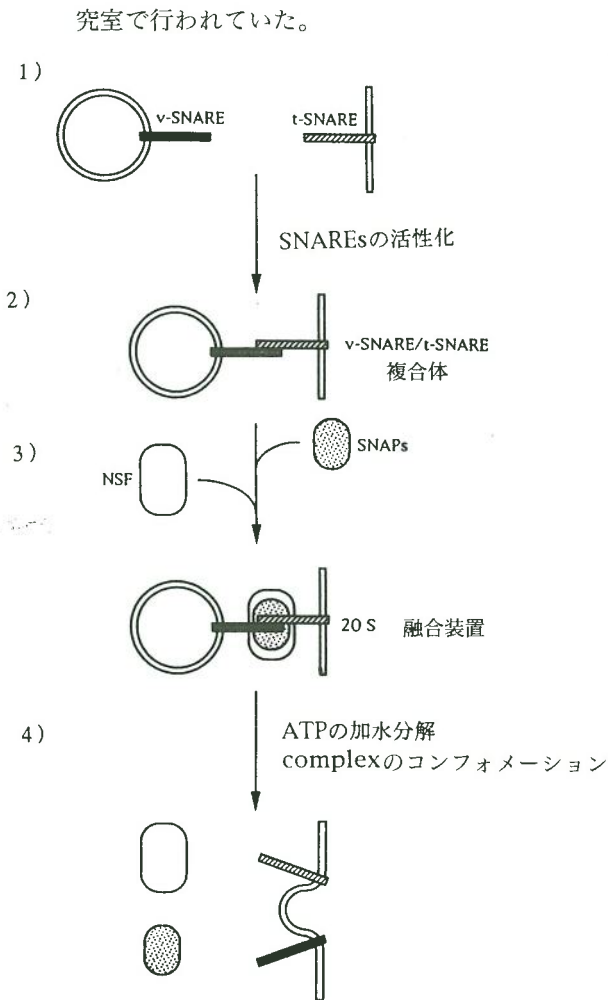


図1 小胞のドッキングと融合の過程のモデル
(文献より引用改変)

3. シナプス小胞からの神経伝達物質放出とSNARE仮説

多くの精力的な研究からSNARE仮説が真核生物の小胞を介した輸送系に広く保存された機構であることが示された。またこれら一連の小胞の輸送機構に関する研究とは独立して、1)シナプス前終末からの神経伝達物質の放出をブロックすることが知られていた tetanus toxin, および botulinum toxin といったニューロトキシンが、いずれも Zn^{2+} プロテアーゼであること、2)最初に見いだされた3つのSNAREsがいずれも、これらのプロテアーゼの特異的基質であること、3)そのプロテオリテックな切断によりSNAREsが不活性化される事により次の段階である神経伝達物質放出がブロックされることが証明

された。これらの研究の流れから、SNARE仮説はシナプス小胞の融合と神経伝達物質放出の過程においても骨格を成す機構であることが示唆された。この神経生化学分野へ広がる研究の流れ、これが筆者を含めた、1994年の8月以降に着任したポストドク達に関わることになるプロジェクトの一つの柱である。

4. シナプスにおける伝達と融合装置

筆者の滞在中ラボから出た大きな成果の一つとして、シナプス小胞からの神経伝達物質放出の過程を新たな因子の関与を含めて説明づけた事を挙げる事ができる。その概要は、シナプス小胞と前膜の融合から伝達物質の放出に至る過程において、小胞内膜内在性のCa結合タンパク質である synaptotagmin がv-SNAREの一つであると同時に、Caセンサーとして働いていること、さらにSNAPsとしては、 α -SNAPの代わりに、脳における高発現が観察されている β -SNAPが機能していることである。さらに、 Ca^{2+} 濃度の変化により迅速(ミリ秒のオーダー)な伝達物質の放出が起こるわけだが、この現象は synaptotagmin が20S complexを活性の高い待機状態に保ち、 Ca^{2+} の結合により高次構造が変化し、速やかに融合の最終段階へと移行させるのでは?とか、放出を阻害することが知られている IP_3 , IP_4 等のリン脂質は、SNAPの synaptotagmin への結合を阻害することにより complexの形成を妨げているらしいとか、まだまだ多くの議論がある。近年、トランスジェニックマウスの作出による新知見も蓄積されつつある。如何に細胞内の機構を正確に反映するか?重要にして難解な課題である。様々な角度の多彩な手法による解析がなされ、それらの結果が互いに補いあうことにより少しずつ真実に近づいて行くように思う。

5. Rothman 研の春夏秋冬

Rothman 研は常時18名前後のポストドクが

うごめいており、お金を湯水のように使って研究を推進させるという、良い意味でも悪い意味でも典型的なアメリカのビックラボであったように思う。上述の研究の流れに眼を通されてお気づきかもしれないが、その仕事の進め方はストーリー性重視というか、最初にモデルあるいは仮説を組み立て、それを証明すべく邁進する！的要素が強かった。こうした研究推進の方法には多くの落とし穴があるように思え、疑問を感じ批判的な気持ちになることも多かった。研究を推進する上で何か優れた組織体制があるのでは？と期待して渡米した身にとって、こうしたやり方を眼のあたりにしたことは些かショックの面もあったが、今までとは全く違った研究の進め方の中に身を置けたことは得難い体験であった。

また、よく言われることだが、研究サポート部分の充実はさすがであり、日本の研究機関も大いに参考にすべき点が多く見受けられた。さらに私が感心したのはポストク達の勤

勉さと広範囲の情報をきちんと把握していることである。日本人研究者の場合、英会話能力以上にその英文読解のスピードが劣っているため、彼等の情報収集になかなか追いついていけない。どんなに時代が進み研究環境が改善されようとも、実際に文献を読み、考え、研究の方向を決め、そしてまとめ行くのは研究者自身に他ならない。英語で発信される情報のなかで何が大切かを的確に判断し吸収して行くことの重要性を身にしみ感じて帰国した私である。

最後にこの2年間、日本には経験できない本当に貴重な時を過ごすことができました。この在外研究の機会を与えて頂いた方々にこの場を借りて、厚く御礼申し上げます。

文 献

Söler, T. (1995) *FEBS Lett.* 369 : 80-83



「火星生物発見」の報告について

東京薬科大学生命科学部
大島泰郎

1. 宇宙に生命はあるか

1953年のユーリー・ミラーの実験以来、多くの実証的な研究が行われ、地球上では生命が化学進化の結果、自然発生したとする仮説が広く信じられている。原始地球を取り巻いていた単純なガス、メタンやアンモニア、二酸化炭素などから、アミノ酸や核酸塩基、糖などが合成された。これらが溶けた原始の海はスープのような栄養豊かな環境で、その中で単純な物質同士が反応し合って、アミノ酸からペプチドができるなどより複雑な物質が生まれ、こうして次第に複雑さを増していった化学反応系の最後に原始生命が生まれたというのである。

この仮説によると、環境さえ整えば地球以外の場所でも単純な物質から生命が発生してくると期待できる。事実、これまでに太陽系では隕石や彗星の尾部にアミノ酸、核酸塩基やその関連物質が存在することが知られている。おそらく隕石の母体となった惑星（かつて火星と木星の間に存在したとされる惑星）の上では、生命の誕生に向かっての化学進化の初期の段階まで反応が進み、単純なガスからアミノ酸などの生体の基礎材料までの合成が進んだが、環境が変化してそのまま凍結されたと解釈されている。彗星については、その頭部の内部ではすでに生命が発生していると主張する学者もいるが、多くの研究者は生体材料の合成の段階に留まっていると考えている。

2. バイキング計画

地球外生命の可能性は高いとしても、太陽系内では惑星環境から、地球のほかには火星がただ一つの生命を宿す可能性を持った惑星と考えられてきた。1970年代に、バイキング計画が行われ、生命を探知するための無人実験室を備えた宇宙船が2艘火星に着陸した(図1)。

バイキング計画で生命を探知するために行われた実験は次の五つである。

- 1) カメラによる観察、苔や藻類がいたら、カメラに写るはずである
- 2) 質量分析計を用いた有機物の検出
- 3) 火星の土に栄養豊かな培養液をかけ、二酸化炭素の発生を検出する実験
- 4) 同じように培養液を与え、培養液中の有機物の分解を調べる実験
- 5) 火星の土に光を当て、光合成による二酸化炭素の固定を測定する実験

結果はすべて否定的であった。カメラには藻類や苔などの繁茂している様子は見られず、何よりも有機物が存在していなかった。その他の「生化学」的な実験も生命の存在を示す結果は与えなかった（一時、胸をときめかす結果が送られてきたが、すぐに無機的な反応によることが分かってしまった）。

多くの人には、特に専門でない人たちには、バイキングの結果は火星に生命の存在する可能性を否定するものと映ったようである。しかし、宇宙科学者の見解は少し違っていた。

バイキングの実験に先立って、マリナー宇宙船などによる火星表面の観測が行われ、かつて予想していた以上に過酷な世界であるこ

OOSHIMA Tairo

とが分かっていたから、専門家たちはバイキング号が生命を探知する可能性はとても低いと予想していた。ところが、バイキング号はかって水の流れた跡や火星の極冠に水が存在することを明らかにした。専門家は、水があったなら過去には生命がいてもよいと考え、バイキング計画は火星生命の可能性にとっては、ポジティブな結果と受け取った。その結果、火星にかつて栄えた生命の痕跡を探したいと、火星上を動き回れる着陸船を送る計画など新たな探査計画が練られていた（不幸にして、先年、その先陣となるべき宇宙船は火星を目前にして行方不明となる事故があった）。

3. 火星生物の証拠

今年の夏、火星由来の隕石中に生命の証拠が認められるという報告は、正式にサイエンス誌上に発表されるに先立って華々しく報道され、世界中にショックを与えたようである。この研究成果はNASAの研究者のほか、スタンフォード大学やカナダの大学も加わった国際共同研究の結果である。

南極アランヒルズで拾われた隕石ALH84001は火星から飛来したものとされ、1万3千年前に地球に届いた。この隕石を調べると、火星の生物の存在を示す三つの証拠が見つかったというのである。ただし、いずれも弱い証拠である。

第一は、フェナントレン、ピレンといった多環炭化水素の存在である。これらの化合物は化石中に多い。これか地上に届いてから、岩石内部に染み込んだのでないことは、局地の雪を調べたり、隕石表面と内部を比べて否定している。多環炭化水素は、化石など生物の遺体が分解した後に多く見つかる。

第二は、隕石中に見られる炭酸塩鉱物の顆粒に磁鉄鉱や硫化鉄が沈着しているという。磁鉄鉱も細菌の化石が作る事が分かっている。

第三は、炭酸塩顆粒の一部は、細菌の遺骸のような構造体であるという。形態は

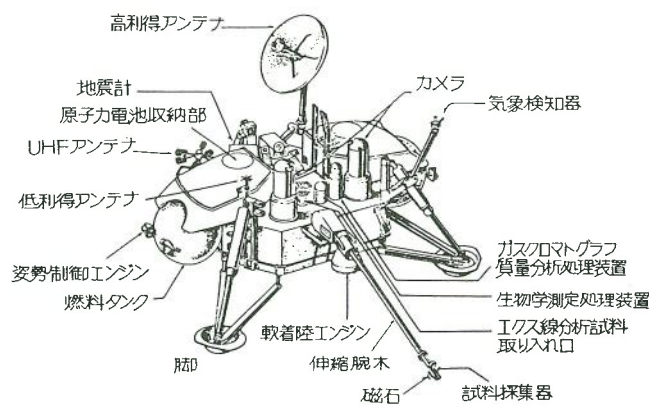


図1 1975年に打ち上げられ、76年に火星に着陸したバイキング着陸船（＝無人科学実験室）の外観

球状も桿状もある。但し、地球の細菌に比べると、細胞の大きさがとても小さい。

4. 証拠は三つもあるが薄弱である

同様な衝撃的な報告は約30年前、1960年代前半にもあった。オルゲイユ隕石（これは火星由来でない）中に化石様の構造体が見つかったと報告され、炭化水素も検出されている。この報告は学術誌上で、また学会の席で激しい論争が繰り返された。結局、「化石でない」と結論され「泰山鳴動してネズミー一匹」という結末となった。今回はそうならないことを祈っている。

炭化水素は化石にも多いが、オルゲイユだけでなくマーチソン隕石などからも比較的容易に検出されている。マーチソンの場合は、今回と同様、多環炭化水素が主成分であり、これらの化合物は非生物的に合成されることを示している。だから、炭化水素の存在はとも弱い証拠である。

磁鉄鉱や硫化物鉱物の全てが生物の作ったものではないから、これらの鉱物の存在は積極的に生命の存在を示すものではない。生命があったとして、矛盾しないという程度の証拠である。

35年前の「隕石中の化石」事件が示すように、細菌の遺骸のような構造体は、隕石など岩石中の鉱物を作る事ができる。今回の証拠は、学問的には「火星に生命がかつて

存在した可能性を否定は出来ない」というに留まるであろう。

5. 今後の展望

とはいえ、火星に生命が存在したことが確認されるなら、エキサイティングな発見である。太陽系に二つも生命を宿せる惑星があるなら、他の惑星系にも多種の生命が存在するはずである。この宇宙は生命に満ちあふれていることになり、ET探しも熱がこもることになるだろう。

火星固有の生命があったなら、研究者には楽しい謎解きが始まる。地球の生物は左手型

のアミノ酸を用いる。火星の生物はどうだろうか？もし、同じように左手型アミノ酸であるなら、生命はなぜ左手型アミノ酸でなければならないのか、その必然的理由をもっと真剣に研究する必要があるだろう。

今回の証拠は弱い。それを補強するには、もっと多くの火星の試料が欲しい。火星の生物がどちら型のアミノ酸を用いていたか、火星生物の生化学を調べるにも、もっと多くの火星の試料が必要である。結局、今すべきことは、今回の結果を議論することではない。火星の試料を入手する方法を議論すべきなのである。



編集後記

キクは私達の生活に最も馴染の深い観賞植物である。商品としては花の美しさもさることながら、葉の下から上まで形が整い深い緑を保っていることが求められる。ところがキクには葉に隆起した白色ないし淡褐色の病斑ができる白さび病が広く発生し商品価値を下げる大きな原因となっている。その防除には2, 3の特効薬が開発されたが、耐性菌が出現して防除効果が低下し、農家は防除対策に腐心している。

ハマギクは白さび病に極めて強い抵抗性を示すことが知られているが、普通のキクとは属が異なっており、交配により抵抗性遺伝子をキクに導入することはできなかった。今回紹介したように、胚珠培養法を利用してキクとの属間雑種の作出に成功した。近い将来この雑種を交配親として抵抗性の中間母本や実用品種が育成されれば、農家は大きな負担から開放されるであろう。 (大畑記)

プレインテクノニュース (第59号)

平成9年1月15日発行

発行者 眞木 秀 郎

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒105 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

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