

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

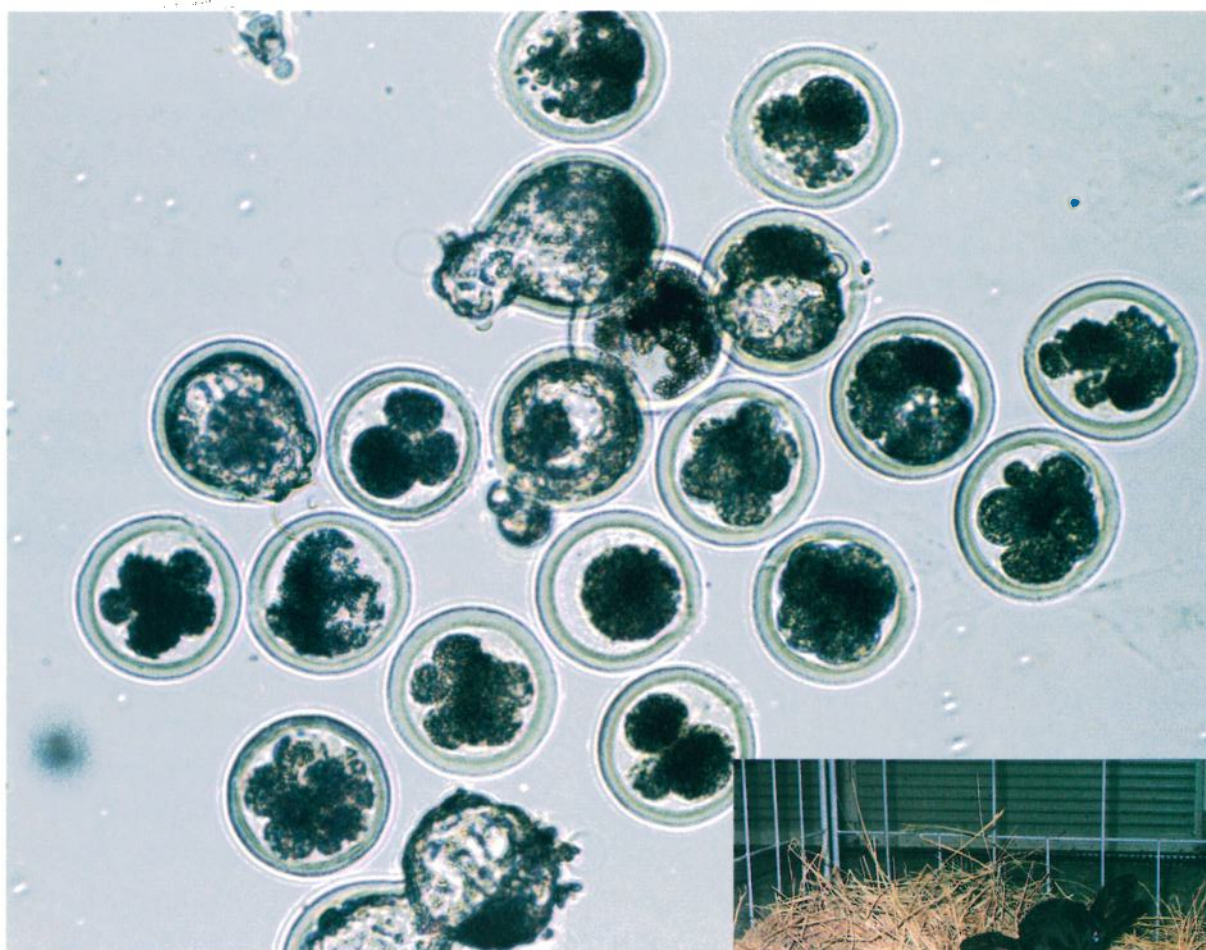
ブレインテクノニュース

第 71 号

JANUARY 15, 1999

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution



黒毛和種雄牛の体細胞クローン牛の作出

上：ドナー細胞と融合し発育した体細胞クローン胚

下：生れたクローン仔牛

(本文19ページ参照)

発行=生物系特定産業技術研究推進機構

総 説

假屋堯由

クローン家畜研究の今後の展望…………… 1

国内情報

朝倉利員・田中敬一

果実の冷温高湿貯蔵：冷温高湿とカビ防止を組み合わせた果実の新しい貯蔵法…………… 5

森本正則・駒井功一郎

カヤツリグサ属植物に含まれる昆虫摂食阻害成分…………… 8

松村 健・恒光 裕

ロタウイルス遺伝子組換え植物による食べるワクチン・医薬品の開発にむけて……………11

佐伯隆清

化学合成ペプチドを用いた安全なウイルス病の診断法の試み

——口蹄疫の血清診断に使用可能なペプチドの探索——……………15

地域の先端研究

志賀一穂

黒毛和種雄牛の体細胞クローン作出……………19

文献情報

組換え遺伝子が周辺に広がる危険性は低い……………23

マウス体細胞の核移植によるクローン個体の作出……………23

ガス型植物ホルモン・エチレンの細胞内シグナル伝達機構……………24

ケイ藻のケイ酸塩消費量比率に対する鉄の影響……………25

海外便り

泉対 博

馬伝染性貧血——遺伝子の変異領域の解析及び本疾病診断法の

国際的統一基準の検討——米国農務省・国立獣医診断研究所での3カ月——……………26

国際会議便り

貝沼圭二

奈良国際シンポジウム「植物バイオテクノロジーは食糧危機・環境危機を救えるか」に参加して……………28

クローン家畜研究の今後の展望

農林水産省 畜産試験場
假屋 堯由

「ドリー」以降、体細胞由来のクローンマウスやクローン牛の誕生が相次いで発表され、哺乳動物においても分化細胞から個体構築できることが実証された。日本における牛の体細胞クローン誕生の背景と、現状での技術的な問題点、産子の評価までの道のり、今後の体細胞クローン研究の展開方向と新産業創出の可能性について述べてみたい。

1. 体細胞クローン研究の現状

我が国では牛の胎子体細胞や成牛の各種体細胞を用いたクローン研究が進められ、平成10年7月5日、近畿大学の角田らは石川県との協力ならびに生物系特定産業技術研究推進機構の基礎研究推進事業によって、世界に先駆けて成体体細胞由来の双子のクローン雌子牛を誕生させた。また、農林水産省畜産試験場のグループは7月24日に鹿児島県肉用牛改良研究所において雄胎子細胞由来の子牛を得、さらに8月18日には成雄牛の耳の細胞から体細胞クローン雄子牛を誕生させている。現在、全国で10頭が生きており、そのうち9頭は成体体細胞由来、1頭は胎子体細胞由来である(表1)。日本に多くの成体体細胞由来クローン牛が誕生していることは、わが国の受精卵移植、体外受精等の繁殖バイオテクノロジーの研究開発の歴史を背景とした技術水準の高さを証明している。

2. 体細胞クローン作出技術

クローン技術とは細胞の核を別な細胞の核と置き換える技術であり、置換細胞を同一胚(受精卵)や同一体細胞由来のものにすれば、原理的には同一の遺伝子を持つ個体が作成できる^{1,2,3)}。クローニングのためには、卵子の核を無傷で取り出す(除核)、細胞の核を卵子に導入する(核移植)、卵子の胚発生を

開始するためのシグナルを与える(活性化)、という手順が必要である。核移植には胚(受精卵)由来のものと同様に体細胞由来があり基本的な手技には共通する点が多い。体細胞核移植は、核を提供する細胞が成体あるいは胎子由来の体細胞であることと、核の初期化(全能性の付与)のために血清飢餓培養を行うことの2点異なる。

卵巣から採取した卵子を体外で培養して成熟させ、MII期で発育を停止したところで卵子の核を除く(除核)。除核は極体を目印にしてガラスナイフ等で卵子の透明帯に穴を開け極体下部の細胞質の一部とともに除去する。一方、畜産試験場と鹿児島県の共同研究では核提供細胞(供核細胞)として雄牛の耳の細胞等を用いた。通常、牛胎子血清10%を含む培養液を用いるが、今回の体細胞の培養は牛胎子血清濃度を0.5%に下げて5日間培養する血清飢餓培養を用いた。この体細胞から採取した核を含む1個の体細胞を除核卵子に移植する。電気刺激(75V~125V, 20~50マイクロ秒, 1~2回)を与えると授精時の精子進入と同じ条件づくりがなされ、両者が融合一体化し発生する。以後は受精卵の培養と同様に約一週間後に胚盤胞にまで発育した胚を移植することで280日の妊娠期間を経てクローン子牛が生れる。

3. 解明すべき技術上の問題

表1 体細胞由来クローン子牛の出生状況（平成10年11月14日現在）

実施機関	頭数	供試体細胞	性別	備考
近畿大学				
石川県畜産総合センター	2	卵管細胞	♀	のと, かが7月5日出生
同上	2	成熟牛体細胞	♀	8月8日(双子)
栃木県酪農試験場 (生研機構委託事業)	3	成熟牛体細胞	♀	9月16日(双子), 11月14日
農林水産省畜産試験場				
鹿児島県肉用牛改良研究所	2	耳皮膚細胞	♂	隼人8月18日, 第2隼人9月29日
富山県畜産試験場	1	胎子肺細胞	♀	千恵9月23日
合計	10			

1) 初期化条件

体細胞の場合は初期化に際して血清飢餓培養が用いられるが、それが必要な理由として以下のようなことが考えられる。卵子は成熟すると減数分裂期である有糸分裂中期（MII期）に達する。MII期は極体が現れX染色体が何時でも働けるようスタンバイした状態である。ここに精子が入ってくると受精してDNA合成が活発になり胚発生のステージが進む。一方、体細胞では通常G1期-S期-G2期-M期-G1期という細胞周期を繰り返す。この周期を一周するごとに細胞は分裂して倍々に増加する。この周期から少し外れたG0期は細胞が休止状態におかれた時期であり、ロスリン研究所のキャンベルらは体細胞をG1期あるいはG0期に止めておく方法として、血清飢餓培養を用いた。血清濃度を下げると、細胞は一種の栄養失調状態に陥り、DNA合成、mRNA合成、タンパク質合成など細胞増殖に必要な機能はほとんど停止し、分化した細胞である体細胞が脱分化され全能性を獲得したものと考えられている。日本でも現在、この方法を用いて子牛が生まれていることから、血清飢餓培養によって体細胞はG0期か少なくともG1期の状態に誘導されていると予測される。ただし、血清飢餓処理は初期化には不必要とする研究発表もあるので今後詳細な検討を要する。

2) 同一性の検証とmtDNAの影響

我が国では能力既知の優良家畜の体細胞をクローンで増殖し利用するテーマが考えられ

ているが「紋次郎」に代表される種雄牛の体細胞を用いて、遺伝子的には「紋次郎」の完全な複製を作成しても、実際に真のコピーであるか否かの同一性・斉一性の検証が今後の命題である。個体の形質発現は移植核が持つ遺伝情報によってかなりの部分が支配されるが、卵子側のミトコンドリアDNA（mtDNA）の関与を全く無視するわけにはいかない。体細胞由来のクローンについては、まだ10頭しか生まれていない段階なのでデータが十分でない。人工授精あるいは受精卵由来クローンにおいては精子あるいは割球由来のmtDNAの動態について、受精後あるいは核（割球）移植後の発生過程において、精子あるいは割球に含まれるmtDNAは次第に減少し、ついにはほとんど検出できなくなり、レシピエント卵子細胞質由来のmtDNAで占められる⁴⁾。同様な現象が体細胞クローンでも起こるのか今後の課題である。いずれにせよ移植核のゲノム情報とレシピエント卵子細胞質のmtDNAの相互作用がクローン産子の発育・能力の表現型にどのような効果や影響をもたらすのか興味のあるところであり、その組み合わせについても検討すべきである。

3) 産子問題

体細胞クローンと過大子の誕生については分娩例数の少ない現時点では明確でないが、体外受精、受精卵由来クローンにおいても時々大きな子牛が生まれることがあり、その発現には研究機関や年次によって偏りが見られている。また、一部のクローン子牛は虚弱であるとか、母牛の妊娠期間が延長する傾向

もいわれている。わが国の10頭の体細胞クローン牛は昨年の9月から実験を開始した研究グループの最初の成果であるが、とりあえずどの体細胞が使えるか試行的に研究をスタートした面が多分にある。畜産試験場のグループが選択した雄牛の耳の細胞が本当に最良の細胞であるかどうかは不明であり、成体には種々の臓器・組織に多数の細胞があり、その意味では選択肢が多すぎる。それをどこに絞ったらよいのか、検討すべき課題がたくさん残されているのが現状であり、性差、年齢等も含めた供核細胞の適正度のスクリーニングが今後の検討課題である。

4. 体細胞クローン牛の評価

体細胞クローン（牛）がすぐにでも実用化され産業上の役に立つ、あるいはその産物が明日にでも食卓にのぼるといった話をしばしば耳にするが、実際にはそう急には研究は進まない。鹿児島県肉用牛改良研究所にいる隼人と第2隼人が順調に成長すると、1年半で成熟して繁殖可能になる。隼人から採取した精液を雌牛に人工授精して子牛を産ませるまでに、今後18カ月+10カ月=28カ月必要である。複数頭の子牛を30カ月飼育・肥育するまでに28+30=58カ月、つまり隼人の評価は約5年間後に行なわれる。したがって、体細胞クローン牛が年に何千頭も生まれて、その肉や牛乳が食卓にのるような時代はまだまだ先のことである。実際にどこまで実用的な技術に構築できるかは今後の課題であり、そのための基盤的研究はこれから始まる。

5. 体細胞クローン技術の持つ意味

体細胞クローン技術は動物の遺伝子組換え（遺伝子導入）に有力な手段を与える。欧米諸国では、体細胞クローン作出そのものが目的ではなく、遺伝子を体細胞に導入して希望するタンパク質を多量に産生する遺伝子組換え家畜を作出し、その体細胞をクローン技術で増やして、医薬品、あるいは臓器移植用の



写真1 成雄牛由来の隼人（右）、隼人2号（左）とレシピエント牛
鹿児島県肉用牛改良研究所提供

臓器の生産などの効率的生産を狙いとしている。従来の遺伝子導入動物の作成は、受精直後の受精卵の雄性前核または雌性前核に遺伝子を注入（マイクロインジェクション法）したが、この方法だと導入遺伝子を持った子畜が生まれる確率は非常に低く、1%以下とされる。仮に200個の遺伝子導入受精卵を作出し、これを200頭のレシピエント牛に移植し、50%の受胎率と計算して、100頭の子牛が生まれても遺伝子導入された子牛は1頭にすぎず、極めて非効率的である。体細胞に遺伝子



写真2 千恵（雌胎子の肺細胞由来）
富山県畜産試験場提供

4 総説

を導入できれば、培養中に高度に目的タンパク質を発現している細胞株だけを選抜し、その核を卵子に核移植して胚盤胞にまで育て、レシピエント家畜に移植することで、遺伝子組換え効率は20%程度に上昇すると考えられる。この場合には10頭のレシピエント家畜から1頭の遺伝子組換え子畜が生まれることになり、日本でも十分対応できる頭数であり非常に大きなメリットである。

遺伝子組換え・クローン技術は、今後、ますます重要になることは確実であり、従来から

考えられてきた初期胚や胚性幹細胞（ES細胞）以外にも、胎子や生体の体細胞までが遺伝子導入細胞として利用できることは、研究の飛躍的な進展を保証するものであり、今後のこれらの分野の研究展開に期待したい。

引用文献

- 1) Wilmut I. *et al.*(1997)*Nature*. 385 : 810~813
- 2) 今井 ほか(1997)畜産の研究, 51 : 1180~1186
- 3) 高橋清也(1997)日動協会報, 73 : 2~7
- 4) 武田久美子ほか(1998)畜産研究成果情報, 畜産試験場, 12 : 7~8

国内情報

果実の冷温高湿貯蔵：冷温高湿とカビ防止を 組み合わせた果実の新しい貯蔵法

農林水産省 果樹試験場
朝倉 利員・田中 敬一

湿度は果実の貯蔵にとって非常に重要な要因であり、冷温高湿（温度0℃，湿度95%以上）条件と負イオン、オゾンによるカビ防止技術を組み合わせると果実の鮮度保持効果が高い。冷温高湿条件では果実のみずみずしさを保つ効果が高く、高湿度で問題となるカビによる腐敗も負イオンとオゾンを貯蔵庫内で連続的に発生させることにより抑えることができる。

1. はじめに

果実の流通を考える場合に重要なことは、「最終的な品質は消費者が判断する」ということである。収穫時点で外観、味とも優れる果実でも、流通段階での取り扱いが悪く鮮度低下が激しいと、消費段階では高品質とはいえない果実となる。このように収穫後の管理は重要な分野であるにもかかわらず、あまり関心が払われていないのが実状である。リンゴのCA貯蔵、カンキツ類の低温貯蔵やプラスチックフィルム利用の貯蔵について研究が行われているものの、果実の貯蔵研究はほぼ終わったという考えさえある。

しかし、モモ、アウトウのように鮮度の低下しやすい果実では貯蔵、流通段階における品質低下の問題を解決するには至っていない。また、ブドウ、ニホンナシ、カンキツ類では高品質果実の流通期間の大幅な延長が切望されている。これらの課題を解決するには、全く新しい発想の貯蔵技術の開発が必要である。

こうしたことから、いままであまり重要視されてこなかった湿度に着目し研究を行ってきた。その結果、湿度は果実の貯蔵性に大きく影響し、高湿度条件では果実の貯蔵性が飛躍的に高まることが明らかになってきた。また、長期貯蔵で問題となるカビによる果実腐敗について、負イオンとオゾンを利用した防止技術の開発が実用化段階をむかえている。

ASAKURA Toshikazu, TANAKA Keiichi

冷温高湿貯蔵は実用化技術としてだけでなく、基礎研究の面でも果実の鮮度低下の機構解明に新しい展開をもたらすものとして注目されている。

ここでは、高湿度条件が果実の貯蔵によい理由、高湿度環境を安定してつくりだす冷温高湿庫の原理と特徴、負イオンとオゾンを併用した新しいカビ防止法、冷温高湿庫とカビ対策を組み合わせた新しい貯蔵法の効果、今後の基礎研究・実用化研究の方向について紹介する。

2. 高湿度条件が果実の貯蔵によい理由

収穫された果実は、呼吸、蒸散、エチレン生成などの生理作用を行いながら鮮度が低下していく。このうち、湿度が直接関係するのは蒸散（水分損失）である。蒸散は果実の重さを減らすだけでなく、みずみずしさ、つやの消失、しわの出現など外観上の品質低下をもたらす重要な要因である。蒸散には温度とともに相対湿度の影響が大きく、一定温度条件では相対湿度の増加につれ蒸散量はほぼ直線的に低下する。一般に青果物はもともとの重量の5%が減少すると商品価値が失われるといわれている（重量の減少は大部分が蒸散によるものである）。

そこで、果実の蒸散量と環境条件、果実条件との関係を解析し蒸散量を予測できるモデルを作成した。そのモデルから、5%重量が

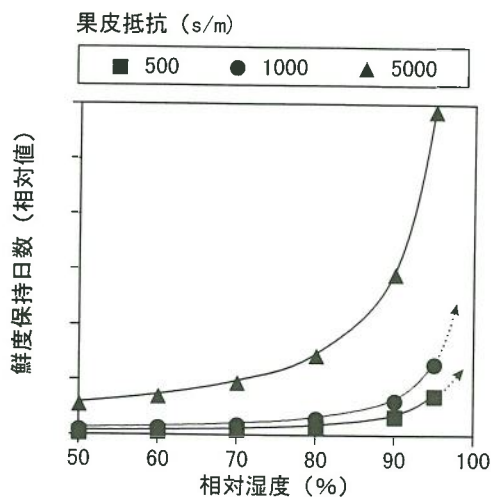


図1 貯蔵果実の鮮度保持日数に対する相対湿度、果皮抵抗の影響(鮮度予測モデルでの計算例) 果皮抵抗500s/m、5000s/mはモモ、ニホンナシ相当する

減少するのに要する日数を計算することができる。この日数は鮮度を保持できる限界の日数に相当する。相対湿度と鮮度が保持できる日数との関係を調べると、相対湿度90%以上では鮮度を保持できる日数が飛躍的に上昇することが予想された(図1)。また、果皮抵抗の小さいモノのような果実は鮮度が低下しやすく、果皮抵抗の大きいリンゴのような果実は鮮度が低下しにくい。果皮抵抗は、果皮における水分の通りにくさを示し、蒸散量の多い果実ではその抵抗値は小さくなる。

そこで実際に、相対湿度85%(従来、好適とされる相対湿度)と95%とで果実を貯蔵したところ、相対湿度95%条件で果実の鮮度保持効果が非常に高いことが確かめられた。すなわち、湿度が低い条件では、モモやオウトウのような果実では、水分損失が激しく傷みやすい。また、ブドウでは果粒への影響は比較的少ないが、果梗や穂軸が脱水・褐変しやすく鮮度が低下しやすい。一方、高湿度条件では水分損失が少なく、鮮度低下・品質低下も少ない。また、低温障害を受けやすい青ウメのような果実でも高湿度条件では障害を受けにくい。鮮度の予測モデルから、相対湿度を95%よりさらに上げることができれば、鮮度保持日数をさらに延ばすことができると予想される。

3. 高湿度を維持する冷蔵庫 (冷温高湿庫)

冷蔵庫内の湿度は、冷却部の大きさとその表面温度に影響される(図2)。通常の冷蔵庫は、庫内の空気を循環させ、冷却部との熱交換により空気を直接冷やす方式である。通常の冷蔵庫の冷却部は小さいので、冷却部の温度をかなり下げる必要があり、そのため霜の付着量が多く除湿されやすい。霜が付着した状態では、冷却効率が低下するので、時々霜取りが必要になる。加湿器により湿度を上げられることも考えられるが、安定的に高湿度を維持するのは困難である。

冷温高湿庫は、壁面全体を冷やす方式であり、冷却面積が大きいため冷却部をあまり冷やさなくてもよく、凝結・着霜量は少ない。冷却面は露が付着した状態であり、庫内の相対湿度は約95%と高湿度を維持することができる。

通常の冷蔵庫では冷却風の吹き出しや冷却面に近い場所ほど温度は低くなり庫内の温度分布の差が大きくなりがちである。庫内の風速を強くすると温度分布の差を少なくできるが、果実からの水分損失が大きくなりやすい。温度安定性が低い貯蔵庫では、設定温度を0℃付近とすると、貯蔵位置によっては凍結のおそれがある。一方、冷温高湿庫では庫内の温度変化が少なく温度分布の差も少ないので、0℃付近の設定温度でも凍結のおそれが少ない。

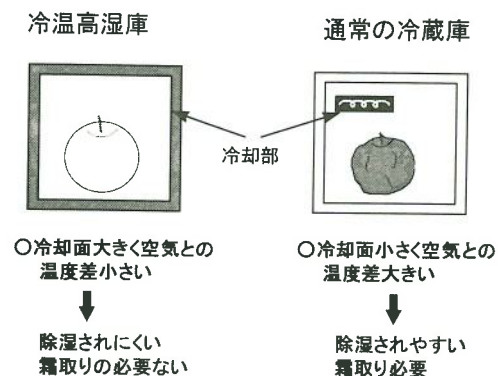


図2 冷温高湿庫(壁面冷却式)と通常の冷蔵庫の比較

4. 負イオンとオゾンを用いた新しいカビ防止法

高湿度条件ではカビによる果実腐敗が発生し問題となることがある。冷温高湿条件では貯蔵期間が非常に長くなり、その結果、貯蔵後期においてカビが発生しやすい。貯蔵期間をさらに延ばすには、カビによる果実腐敗を確実に抑える技術が必要である。

日本では収穫後の果実は食品とみなされ、食品衛生法によりポストハーベスト農薬の使用は禁止されている。抗菌作用のあるヒノキチオールや銀ゼオライトを使ってカビ防止の効果を検討したが、安定した効果は得られなかった。そこで、三菱電機と共同研究を行い、負イオンとオゾンを利用した全く新しい果実のカビ防止技術を開発した。負イオン、オゾンとも自然界に存在する物質であり、ともに殺菌作用があり、残留性はない。

従来のオゾン処理法は果実を高濃度短時間で処理し貯蔵するという方法である。この方法は表面的な殺菌となるので、果実内部の菌や貯蔵後に感染する菌については防止手段がなく、殺菌効果が長続きしないという問題があった。また、高濃度オゾンは人や果実への障害の危険性もある。そこで、オゾン濃度を安全なレベルまで低くし（50ppb）、負イオン濃度を高くし（ 5×10^4 個/cm³）、両方を庫内空气中に連続的に処理する方法を開発した。この方法は常時殺菌していることになるので効果が安定しており、庫内に浮遊するカビや細菌の数も非常に少なくすることができる。

5. 冷温高湿貯蔵の効果

冷温高湿条件（気温0℃、湿度95%）と負イオン+オゾンを組み合わせた貯蔵法は、果実のみずみずしさを保つ効果が高く、長期貯蔵で問題となるカビの発生を防止できる（図3）。

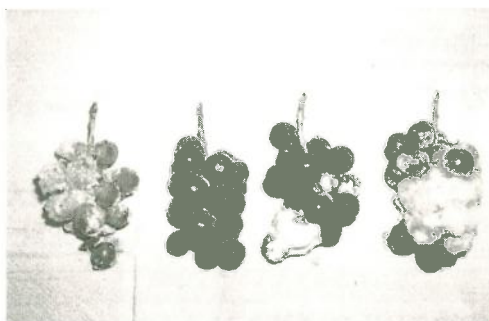


図3 冷温高湿庫に貯蔵したブドウ「巨峰」
（4か月後）
左から順に、対照，負イオン+オゾン
処理，オゾン処理，対照

糖度、酸度の変化も比較的少ない。この貯蔵法により、オウトウ‘佐藤錦’では1か月、モモ‘あかつき’では1か月、ニホンナシ‘幸水’では5か月、ブドウ‘巨峰’では4か月、ウンシュウミカン‘青島温州’では5か月の貯蔵が可能であり、従来の貯蔵法に比べ約5倍の鮮度保持効果が認められた。

6. 今後の展望

高湿度領域では果実の鮮度を保つ効果が高く確実なカビ対策を行えば果実の貯蔵性が飛躍的に高まること、低温障害を受けやすい果実でも高湿度条件にすれば低温障害を回避することができること、等が明らかとなった。このことは、従来の好適貯蔵温度・湿度の定説を覆す可能性があるだけでなく、果実の老化、低温障害の発生に対する果実の体内水分の重要性を示すものと考えられる。果実からの水分損失は、単なる物理的な影響だけでなく、細胞の生理的変化を引き起こしていることが考えられる。今後、水に関係した果実の品質劣化機構の解明とともに冷温高湿貯蔵システムの実用化に向けた研究を進める予定である。

文献

- 1) 朝倉ら (1997), 園芸学会雑誌66別1, 578-579
- 2) Tanaka, K, et al. (1998) *Suppl. J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67(1):330

国内情報

カヤツリグサ属植物に含まれる昆虫摂食阻害成分

近畿大学農学部

森本 正則・駒井 功一郎

カヤツリグサ属植物であるアオガヤツリ (*Cyperus nipponicus* L.) より、昆虫摂食阻害活性成分としてクマラン (2,3-ジヒドロベンゾフラン) 類のレミロールを単離同定した。さらに、タイ国で採集した同属植物 (*C. distans* L.) からも同様な昆虫活性を示す天然化合物としてスカベキノンを得た。さらに、構造活性相関の検討のため種々のクマラン誘導体を作成し活性評価を実施した結果、アセチル基の導入が活性向上に効果的であることが明らかとなった。

1. はじめに

カヤツリグサ属植物は、温帯から熱帯にかけて世界的に広く分布する草本類である。本草は主に畑地や水田の強害雑草として防除の対象となっている。しかし、ある種は園芸、薬用などの目的で栽培され、国内では大分県の特産品であるシチトウ (*C. monophyllus* Vahl) が畳表の原料として栽培される。また、ハマステ (*C. rotundus* L.) やコゴメガヤツリ (*C. iria* L.) は漢方生薬として利用されている。本属の成分はテルペノイド¹⁾ やクマリン²⁾、キノン類³⁾ が主なものであるが、なかでもシベラキノンに代表されるようなジフラン型のベンゾキノン類は本属に特有の天然化合物といえる。また、コゴメガヤツリには昆虫が利用するものと同様のJH III 生産が認められ、殺虫活性を示すことも報告されており、これらが昆虫に対する化学的防御物質である可能性を示唆している⁴⁾。

これら植物の昆虫抵抗性化合物の検索と、それらの農業用害虫忌避剤への応用研究を実施したところ、上記のカヤツリグサ属植物に含まれる数種の化合物がそのリードとして利用可能であることが明らかとなった。

2. 植物からの摂食阻害活性物質

カヤツリグサ属栽培作物であるシチトウは、その

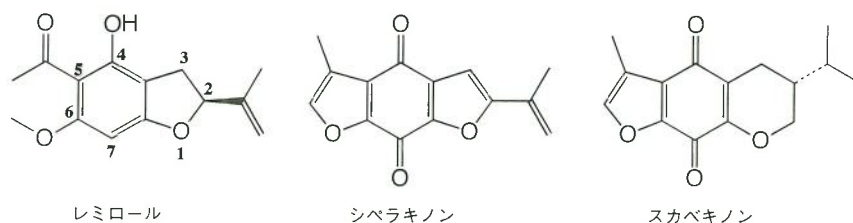
MORIMOTO Masanori, KOMAI Koichiro

の塊茎および茎部を蛾類幼虫イトトガによって食害されることが知られているが、イトトガ幼虫はシチトウ以外にもミズガヤツリやオニガヤツリなどの大型カヤツリグサ類に食入する。このような事象から当初、本種蛾類幼虫のカヤツリグサ属植物への寄主植物選択因子の究明を行ってきた。しかし、本草はその他の昆虫からの被害が比較的少ないことが認められ、一般的な昆虫に対する抵抗因子の存在が予測できた。そこで、雑食性昆虫であり蔬菜害虫でもあるハスモンヨトウ (*Spodoptera litura* F.) 幼虫の摂食行動を指標とした生物検定によってカヤツリグサ属植物の化学的昆虫抵抗性因子の検索を行った。

その結果、アオガヤツリより摂食阻害活性を有する化合物として、レミロールを単離同定した。同様に熱帯産カヤツリグサ属植物のスクリーニングを実施したところ、その一種である *C. distans* より、フラン環とピラン環を有する天然化合物であるスカベキノンを昆虫摂食阻害活性物質として単離・同定した。本化合物が、検討したカヤツリグサ属植物由来の天然化合物中、最も昆虫摂食阻害活性が高いことが明らかとなった (図1, 表1)。

3. クマラン誘導体の構造活性相関

実際の害虫防除剤のリードとして利用するにあたり、カヤツリグサ属植物より単離・同定された昆虫活性化合物のレミロールおよびスカベキノンは、その化学構造上のどのよう



アオガヤツリより単離された化合物

タイ国産カヤツリグサ属植物より単離された化合物

図1 カヤツリグサ属植物由来の天然化合物の化学構造

表1 カヤツリグサ属植物から単離した天然化合物のハスモンヨトウ3齢幼虫に対する昆虫摂食阻害活性

供試化合物	昆虫摂食阻害活性		由来
	ED ₅₀ (mol / cm ²)	pED ₅₀ (mol / cm ²)	
シベラキノン	1.7 X 10 ⁻⁷	6.77	<i>C. nipponicus</i>
レミロール	1.3 X 10 ⁻⁷	6.89	<i>C. nipponicus</i>
スカベキノン	2.6 X 10 ⁻⁹	8.59	<i>C. distans</i>

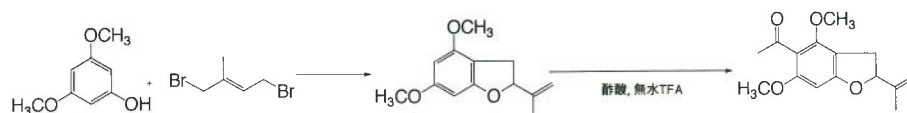


図2 クマラン誘導体の作成

な性質がその生物活性に大きく関与しているのかを検討する必要があった。スカベキノンはその化学構造の基本骨格構築が困難と予想されたため、レミロールをその構造活性相関検討の材料として採用した。クマラン誘導体は各種置換フェノールから1,4-ジブプロモ-2-メチル-2-ブテンを有機化学的に反応させることで容易に得られた⁵⁾ (図2)。(ここで得られてくる合成クマランはラセミ体となるので厳密には天然物とは異なるが、置換基の及ぼす影響等を検討するには十分であると判断した)この様に種々の誘導体を作成し生物検定を行うことで、化学構造の変化に伴う昆虫摂食阻害活性がどのように変化するかを検討した。

主な構造改変はベンゼン環上のメトキシ基、アセチル基の置換位置と置換数であり、このような化学構造の違いによる昆虫摂食阻害活性には変化が認められた。全く置換基を持たない誘導体はわずかな摂食阻害活性しか認められなかったが、メトキシ基を導入すると活性は向上した。その置換基数は二置換体以上では活性の向上が認められなかった。ア

セチル基の導入は効果的に活性を向上させる傾向が認められ、なかでも7位置換体と5位置換体を比較すると、明らかに7位置換体の方が活性が向上することが明らかとなった。その中でも最も高い活性を示した誘導体は7-アセチル-4,6-ジメトキシクマランであり、プロビット法を用いて算出した供試化合物の活性指標値ED₅₀値は5.4 X 10⁻⁹ mol / cm²を示し、これは置換基を持たない誘導体の約120倍の活性であり、天然物であるレミロールと比較すると約13倍の活性の向上が認められたことになる (表2)。

表2 クマラン誘導体のハスモンヨトウ3齢幼虫に対する昆虫摂食阻害活性

ベンゼン環上の置換基特性	ED ₅₀ (mol / cm ²)	pED ₅₀ (mol / cm ²)
置換基なし	1.1 X 10 ⁻⁶	5.96
6-メトキシ置換体	6.3 X 10 ⁻⁷	6.20
4,6-ジメトキシ置換体	5.3 X 10 ⁻⁸	7.28
4,5,6-トリメトキシ置換体	5.6 X 10 ⁻⁸	7.25
5-アセチル置換体	7.4 X 10 ⁻⁸	7.13
5-アセチル-4,6-ジメトキシ置換体	2.8 X 10 ⁻⁸	7.55
7-アセチル-4,6-ジメトキシ置換体	5.4 X 10 ⁻⁹	8.27
7-アセチル-4,5,6-トリメトキシ置換体	1.6 X 10 ⁻⁸	7.80

4. その他の生物活性

これらカヤツリグサ属より単離した昆虫摂食阻害物質の魚毒性および植物毒性を検討した結果、24時間後におけるミジンコに対する魚毒性はそれぞれの天然化合物に認められるものの、その毒性発現速度に違いが認められた。急性毒性としてはスカベキノン、レミロール、シペラキノンの順でミジンコに対する急性毒性が高いことが認められた。この活性順は昆虫摂食阻害活性の強度とよく一致する事が興味深い。

また、レタス幼苗を用いた生育試験では250ppmでも全くその成長を阻害しなかった。このような作用特性を有することから、これらの化合物群の活性発現性は、ロテノン様な作用機構を示すのではないかと推測がなされたが、詳細な検討により、ロテノンの作用点である電子伝達系の複合体Iに対する阻害活性はほとんど認められなかった。

5. おわりに

ベンゾフランおよびその他のフラン誘導体は細胞毒性が高いことが知られている。それらの細胞毒性はフラン環の生体内での化学変化によって高活性なアルキル化剤となりうることに起因すると一般的にいわれている⁶⁾。しかし、クマランはジヒドロ化されたフラン環を有することから、その細胞毒性が低く安全性が高いと思われるが、これらの詳細につい

ては現在検討中である。

今日までに昆虫摂食阻害活性物質を害虫防除に利用しようとする試みは多くなされているが、リモノイドのように化学構造の複雑さや不安定さから今のところ実用化には至っていない⁷⁾。また、昆虫の生育ステージが進むにつれその薬剤感受性が大きく低下することも原因の一つであろう。

我々も、今後さらに検討を重ね、作用特性や必須構造の決定などを明確にし、さらには実際の圃場試験に耐えうる様な剤型を検討後、試験データを収集する必要がある。現在の殺虫剤のように害虫を根絶しようとする薬剤の生態系への影響は甚大であり、時としてその特質によって、生物相の偏りを招き、ひいては害虫の大発生を招きかねない。それらの諸問題を解決すべく天然物由来の環境調和型害虫忌避剤のさらなる発展を期待したい。

参考文献

- 1) Ohira S. *et al* (1998) *Phytochemistry* 47(8): 1577-1581
- 2) Dini A. *et al* (1993) *Biochemical Systematics and Ecology* 21(2): 305
- 3) Allan R.D. *et al* (1969) *Tetrahedron Letters* 53: 4669-4672
- 4) Schwarts A.M. *et al* (1998) *Journal of the American Mosquito Control Association* 14(1): 78-82
- 5) Yamaguchi S. *et al* (1987) *Bulletin Chemical Society of Japan* 60: 3603-3605
- 6) Mugford C.A. *et al* (1997) *Toxicology and Applied Pharmacology* 144: 1-11
- 7) Murray K.D. *et al* (1993) *Journal of Economic Entomology* 86(6): 1793-1801

国内情報

ロタウイルス遺伝子組換え植物による食べるワクチン・医薬品の開発に向けて

株式会社北海道グリーンバイオ研究所 松村 健
農林水産省 家畜衛生試験場 恒光 裕

近年、動物や微生物の遺伝子を植物に導入し、植物をバイオリクターとして利用し、医薬分野に応用していこうという研究が欧米で実施されている。しかしながらわが国においては、このような研究は現在までほとんど報告されていない。われわれは人を含む多くの哺乳類に下痢を起こすロタウイルスを研究材料とし、食べるワクチン開発を最終目標に本ウイルス遺伝子をジャガイモに導入する研究を開始した。本報では、ロタウイルスの内殻蛋白質であるVP6の発現成績を中心に述べる。

1. はじめに

現在、動物の病原体遺伝子などを植物ウイルスベクターや遺伝子組換え技術を用いて植物に導入し、植物を物質生産の場として利用することにより、栽培という容易な手段を用いて安価に、しかも大量に目的蛋白質を生産させる試みが行われてきている。このようにして生産された蛋白質をもし経口ワクチンなどに利用できるならば、非常に多くの利点が考えられる。すなわち、いままでのワクチン製造のように特殊な無菌的施設等の必要がなく、特に培養細胞等を使って生産する場合に比較して高価な試薬等も必要なくなることから、十分に生産コストを下げることができ、安価なワクチン供給への道が開ける可能性がある。また、植物でできたワクチンはそのまま経口投与が可能のため、大量の注射器具や接種を行うための医師、看護婦等の必要がなく、注射によるストレスも無い。このような利点は、医療施設や医師の絶対数が不足がちな発展途上国などにおいて特に有用なワクチンとしての利用が期待される。家畜においても、従来に無い低価格且つ省労力でワクチン効果が得られるとなれば、十分にその用途は開けてくるものと思われる。加えて、農産物に新

しい付加価値を与えるため、農業経済上においても好ましい効果が期待される。以上のような背景に、諸外国、特に米国を中心として遺伝子組換え植物による食べるワクチンや医薬品の開発が近年いくつか試みられてきている(表1)。これらの実験例の中には、コレラトキシンのように実際にボランティアによる経口投与試験が行われ、抗体価の上昇を認めるにまで至っている。

表1 動物病原体遺伝子を植物で発現させた例

導入遺伝子の由来となる病原体	実験に用いられた植物
B型肝炎ウイルス	タバコ ジャガイモ
ノーウェアクウイルス	タバコ ジャガイモ
大腸菌エンテロトキシン	タバコ ジャガイモ
ヒトエイズウイルス gp41	タバコ
HRV (リノウイルス)	タバコ
マラリアエビトープ	タバコ
Murine zona pellucida ZP3 protein	タバコ
Foot-and-mouth disease VP1	アラビドプシス
コレラトキシン	ジャガイモ
Mink enteritis virus VP2 capsid	ササゲ
狂犬病ウイルス	ホウレンソウ タバコ トマト

2. ロタウイルスについて

我々がターゲットにしているロタウイルスは抗原性の違いによりA-G群に区別され、A群ロタウイルスは多くの哺乳類や鳥類に感染

し激しい下痢症状を引き起こす。本ウイルスによる乳幼児の死亡は、年間100万人にもものぼると言われており、家畜においても子牛や子豚では、発生率が30%前後、死亡率は0～50%とされているが、初乳摂取不足、寒冷感作、他の病原微生物との混合感染などの危険因子が関与した時には死亡率が最大90%まで上昇するとも言われている。ロタウイルスの伝播は、主に糞口感染であり、ウイルスを含む糞便が直接あるいはウイルスに汚染された物体を通して経口的に侵入することによって起きる。本ウイルスの感染力は非常に強く、また糞便1gあたりのウイルス量は 10^{11} 粒子にもものぼる。これは、最大 10^7 - 10^8 頭の若齢動物を感染させることができるウイルス量である。ロタウイルスは、自然環境下で安定であり、またいくつかの消毒薬に対して抵抗性を示すことなどから、本ウイルスの清浄化は困難とされている。

3. ロタウイルスワクチンの現状と戦略

上述したように、ロタウイルス感染によって起こる下痢の被害は人ならびに家畜において極めて大きい。今年（1998年）になりようやくヒトロタウイルスワクチン（サルロタウイルスにヒトロタウイルスVP7遺伝子を置換したリアソータントウイルスワクチン）の米国での承認・販売・使用が承認された。しかし、本ワクチンの推定価格（9-51ドル）

を考えると、下痢の被害が最も大きい発展途上国での使用は現状では困難といわざるをえない。家畜においては、欧米で牛や豚用のロタウイルスワクチンが市販されているが、わが国にはない。経済動物である家畜では動物用医薬品価格とその経済効果の収支が製薬会社で開発販売を実施するか否かの大きな決定要因であるが、現時点での家畜用ロタウイルスワクチンの効果は不定である。

近年、これらワクチン以外にもサブユニットワクチンの開発が行われている。サブユニットワクチンは、感染防御に必要な蛋白のみを含むため安全性が高い上、強力な免疫効果が期待される。ロタウイルスは三重層構造をとるウイルスで、VP2蛋白質がコア膜層、VP6蛋白質が内核層、VP4とVP7蛋白質が外殻層を構成している（図1）。主に、感染防御抗原の役割を果たすのは、VP4とVP7であるが、経口的にこれらの蛋白質だけを投与した場合、実際の感染防御の場面である腸管に達するまでに消化・分解されてしまう可能性が大きい。もし、たとえ消化・分解されなくても腸管での免疫原性を有する可能性は非常に低い。そこで、我々はまず、ウシA群ロタウイルスVP2とVP6蛋白質の遺伝子を植物に導入して発現させ、植物体内でウイルス様粒子（VLP）を構成させることを最初の目標としている。VP2とVP6でVLPが構築され、この非感染性のVLPはコレラトキシンなどの経口アジュバントと一緒に経口投与することにより腸管局所における免疫を誘導することが既にバキュロウイルス発現系を用いた実験により報告されている。さらに、VP4とVP7の遺伝子を植物に導入して感染防御免疫を誘導可能な、感染性・病原性のない三重層ウイルス粒子の構築を次の目標としている（図2）。

4. ウシロタウイルスVP6遺伝子導入ジャガイモの作出

一般に植物以外の遺伝子、特に動物由来の遺伝子をそのままの配列で植物に導入しても、

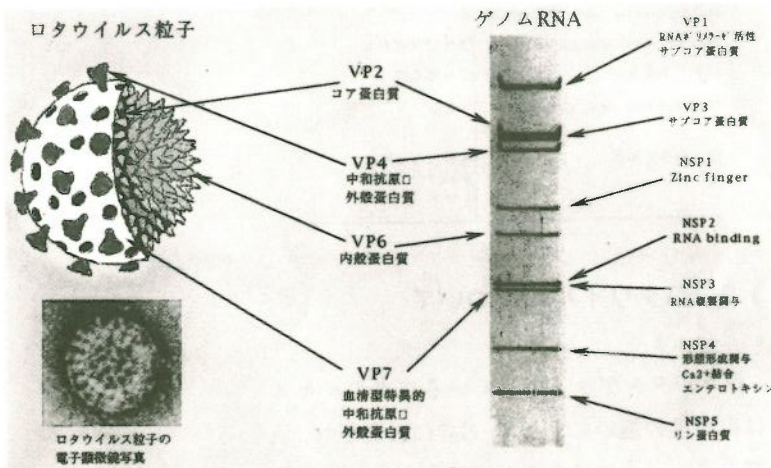


図1 ロタウイルス粒子構造と対応するウイルスゲノムの構成。

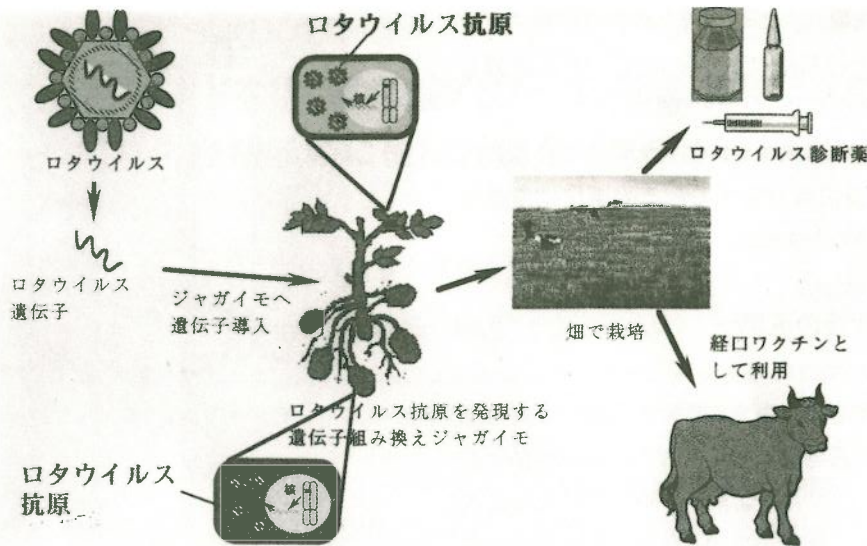


図2 ロタウイルス遺伝子組換えジャガイモの利用方法

コドン使用頻度の違いや、mRNAの安定性の違い、開始コドン近傍配列による発現量の強弱の有無等、発現調節に関わる機構が少しずつ異なるため、期待した蛋白質の発現を見ることは一般に困難だともいわれている。そこで、我々もVP6 遺伝子のコドン使用などを解析した結果、双子葉植物で頻繁に使われるコドン使用頻度とは多少異なることを確認した。しかし、そのままの遺伝子を導入した結果をまず見ようということ、何の変異操作も行わないウシロタウイルスVP6 cDNA断片をジャガイモに導入した。導入自体は、既に定法となっているアグロバクテリウム法を用いて行った。

この結果、約70個体の再分化ジャガイモ個体を得、各個体に於けるVP6 遺伝子発現産物の有無を葉1gから磨砕して得られた粗汁液3mlをロタウイルス抗体を用いてエライザ検定した結果、19個体で明らかにVP6蛋白質の発現が確認できた。これらの個体のいくつかを閉鎖系温室で育成し、得られた塊茎1gを同様に磨砕し、エライザ検定した結果、ほぼ葉と同量の発現蛋白質が確認でき、最も発現量の高い個体では組織1gあたり100ngのVP6蛋白質が発現していることが明らかになった(図3)。そこで、この植物由来のVP6蛋白質が免疫原性をもっているかを確認するために、組換えジャガイモNo.62の葉50gを液体窒素下で磨砕後、緩衝液にて抽出した粗

汁液を、100,000×g 5時間の遠心分離し、その上清を分子量30Kの限外濾過膜を用いて5mlに濃縮、その0.5mlを等量のアジュバントと混和して2週間間隔で2回、マウスの腹腔内に接種した。2回目の接種から2週間後に

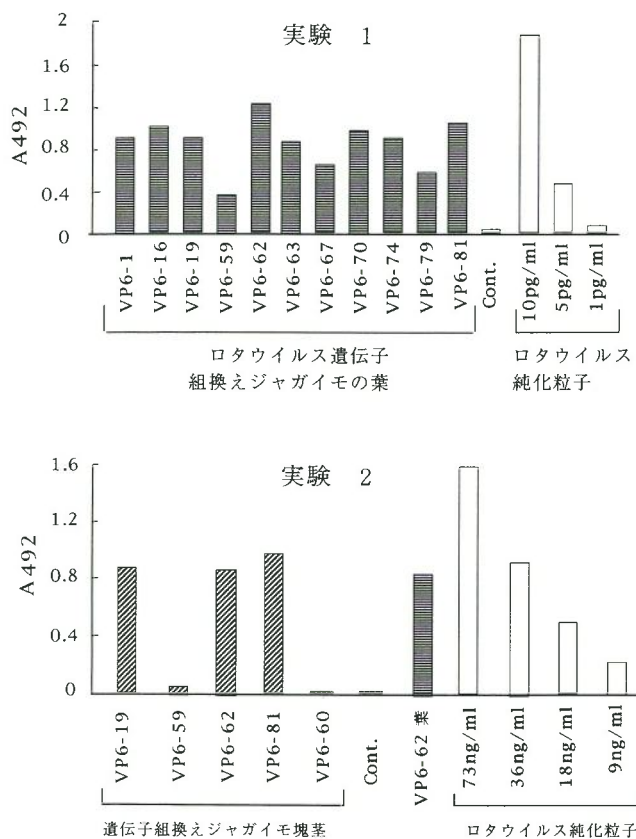


図3 遺伝子組換えジャガイモの葉(実験1)と塊茎(実験2)でのELISA検定によるVP6蛋白質発現の確認。実験1と2では、磨砕液の希釈倍率が異なっている。

血液を採取し、この血清をロタウイルスと反応させた結果、ロタウイルスVP6蛋白質とのみ特異的に反応した(図4)。

これらの結果から、組換えジャガイモ体内でVP6蛋白質が発現し、この蛋白は免疫原性を持つことが確認された。

5. 今後の展開

同一血清群内のロタウイルス間には共通抗原(交差反応性抗原)がVP6上に存在する。よって、ウシA群ロタウイルスの抗血清は人を含め他の動物由来のA群ロタウイルスともエライザや蛍光抗体法などで反応する。たとえば、今回のウシA群ロタウイルスVP6遺伝子組み換えジャガイモのエライザ検定において、ホモのウイルスに対する抗血清とヒトA群ロタウイルス抗血清を両方用いたが、同様の結果が得られている。即ち、今回作出した組換えジャガイモの粗精製液によって免疫したマウスの抗血清は、ウシロタウイルスだけではなく人を含む他の動物種由来のロタウイルスの検出にも利用可能であると推測される。現在、ヒトロタウイルスの検出・診断薬はいくつかの製薬会社から市販されているが、その抗血清作出用の抗原に組換えジャガイモを用いることにより、より低コスト化が図れるのではないかと考えている。また、VP6蛋白が塊茎でも発現していることから、この塊茎をマウスに経口投与し、VP6のみでも免疫が誘導されるか否かの検討を試みたいと思っている。

さらに、VP2遺伝子を導入した組換えジャガイモの作出ならびに、VP2とVP6遺伝子の両方を導入した組換えジャガイモによるVLPの構築を図る予定である。

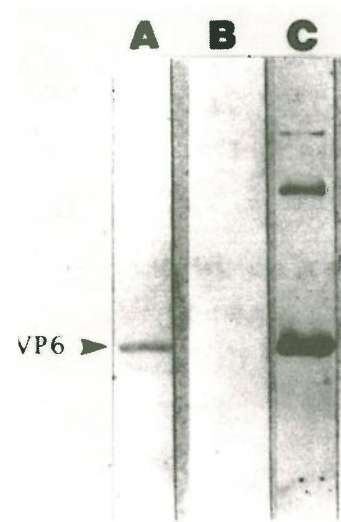


図4 組換えジャガイモ蛋白質由来抗血清とロタウイルス粒子の血清反応。

A:VP6遺伝子組換えジャガイモ粗精製液で免疫したマウス抗血清
B:免疫前マウス血清
C:ロタウイルス粒子で免疫したモルモット抗血清
矢印:VP6蛋白質

6. おわりに

動物の有用遺伝子や動物病原体由来の遺伝子を植物に導入し、植物体を医薬品の生産工場やワクチンとして利用するといった研究は、今後より盛んになってくるものと思う。一般に、動物の遺伝子をそのまま植物に導入してもうまく働かないといわれており、たしかに、今回我々の用いたVP6遺伝子はそのままで発現が確認されたが、他の材料を用いた実験では全く発現しない遺伝子もあれば、発現量が非常に低く、遺伝子改変をして導入を試みている実験もある。結局、用いる遺伝子により個々の検討が必要だと言うことであろう。

なお、この研究は、平成10年度から開始された株式会社北海道グリーンバイオ研究所と農林水産省家畜衛生試験場との官民交流共同研究によって行われているものである。

国内情報

化学合成ペプチドを用いた安全なウイルス病の診断法の試み -口蹄疫の血清診断に使用可能なペプチドの探索-

農林水産省 家畜衛生試験場

佐伯 隆清

近年著しい進歩を遂げたペプチドの化学合成法を応用し、本物のウイルスを用いないウイルス性疾病の有効な診断法がAIDSや肝炎ウイルスなどで試みられている。本稿では、家畜のウイルス性疾病の中で最も感染性・伝染性が強く危険なため、日本国内では実験室内でも扱うことが不可能である、口蹄疫ウイルスに関連した抗原用ペプチドを多数化学合成し、本病の存在する国々などで用いられている病原体や病原体由来の構成物を全く使用しない極めて安全な口蹄疫の診断法を確立するための試みを行ったので、その概要を紹介する。

1. はじめに・口蹄疫とは？

口蹄疫(Foot-and-mouth Disease ; FMD)は、口蹄疫ウイルス(Foot-and-mouth Disease Virus ; FMDV)の感染により起こる家畜の急性熱性伝染病で、牛、水牛、豚、綿羊、山羊等の主として偶蹄類の家畜に感染し、口部や蹄部の周辺の粘膜・皮膚に水泡性の特徴ある病変を示すことにより、「口蹄疫」という名前が付けられている。病原体は、RNAウイルスの中でも最も小さな種類のピコルナウイルスに分類されている。

農場や放牧場で本病の発生があると、その伝染力が極めて強いため、発生農場の全ての感受性家畜に数日以内に伝染し、次々と隣接した農場に蔓延して多くの場合集団的な大流行の形をとり、広範囲な地域や国々に莫大な被害を与える事が過去に沢山報告されている。そのため、数多い家畜の伝染病の中で、口蹄疫は世界的見地からも最も恐れられている家畜の疾病とすることができる。

2. 化学合成ペプチドを用いた新しい口蹄疫の診断法確立に向けて

口蹄疫ウイルスは図1に示すように、L、
SAEKI Takakiyo

1A, 1B, 1C, 1D, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C及び3Dの12種類の蛋白を持っている。そのうち1A～1Dの蛋白がウイルスを構築する構造蛋白質で、残る8つの蛋白は非構造蛋白質に分けられる。

口蹄疫ウイルス(FMDV)に感染した動物の血液中には、ウイルス構築蛋白質に対する免疫抗体が産生されるが、これらの蛋白は非常に多くの種類が存在する口蹄疫ウイルスの株の差により、それぞれ異なることが多く、そのため、感染した動物の抗体を調べるためには多くの種類の抗原(または抗体、若しくは中和反応では同一血清型のウイルス等)を必要とし、極めて複雑な手技が要求され、しばしばその組み合わせにより検出が不可能となることが考えられる。

一方、FMDVは自らの遺伝子を合成するRNA依存性のRNAポリメラーゼ(3D蛋白質)を始め、多くの非構造蛋白質を持っているが、これらはすべての7つの血清型に比較的共通した部分が多く、かつ、最近の精製度の高いワクチン接種では、(構造蛋白質以外の非構造蛋白質などの夾雑蛋白質はワクチン製品中には極くわずかしかなかったため)非構造蛋白質に対する抗体はほとんど産生されず、一方、ウイルスに本当に感染した動物の血液中には顕著に認められることが知られている。

938~953					1579~1649				
1~217	218 ↓ 286	287~504	505~724	725~937	954 ~1107	1108~1425	1426 ~1578	1650 ~1862	1863~2332
(L)		(1 B)	(1 C)	(1 D)	(2 B)	(2 C)	(3 A)	(3 C)	(3 D)
(1 A)			(2 A)			(3 B)			

図1 口蹄疫ウイルスO1K株のポリプロテインの構造とスプライシング部位
Lから3Dまでの12種類の蛋白を示す。図中の数字は各蛋白を構成するアミノ酸の配列順位と数を示す

従って、多種類の口蹄疫ウイルスの感染の有無を診断するため、感染動物の非構造蛋白質に対する血清型共通の特異抗体を検出する方法の確立は、我が国のような清浄地域での口蹄疫の侵入防止に役立つのみならず、口蹄疫の流行している、いわゆる常在国において、ワクチンの投与により、流行区域を縮小しつつある地域での、本当の感染による感染抗体と、ワクチン投与によるワクチン陽性抗体の区別にも活用が期待され、非常に重要な意義を持つ。

現在までに、多くの研究者により診断用抗原として3D蛋白質についての試みが種々行われているが、3D部位は余り抗原性が高くないうえ、近縁のウイルスと共通のアミノ酸配列をもつ部分が比較的多く、そのために非特異反応がしばしば問題となり、高感度の検出系の実用化は困難であった。

そこで、家畜衛生試験場海外病研究部では、経常研究課題「口蹄疫ウイルスに関連する有用ペプチド開発の基礎研究」を設定し、著者を中心として、ウイルスを全く使用しないで、我が国への口蹄疫の侵入防止に有効な技術開発を試みた。紙面の制限から、ペプチドの合成法や血清反応の概略、合成ペプチドを用いた一般的なウイルス病の診断法などについては本稿では省略するので他の成書・総説など^{1,2,3,4)}を参考されたい。

3. 研究の概要

海外から侵入する危険性の高い家畜の伝染病、即ち海外悪性伝染病の中で最も重要である口蹄疫ウイルスの研究・実験材料としての

国内導入はいまだ行われておらず、現在のところ病原体を使用した直接的な試験・研究は国内では実施する事は全く不可能である。そこで、口蹄疫ウイルスに関連した部分ペプチドを化学合成し、天然の口蹄疫の診断用の抗原に代わり、(偽物である)人工抗原が使用可能か否かを検討した。

ウイルスを構築する1A~1Dを除いた8種類の非構造蛋白質部位のうち、最もよくアミノ酸配列の解明されているO1K株(図1)をモデルとして、近縁の他のピコルナウイルスとは配列が異なり、かつ、比較的親水性のアミノ酸より構成され、抗原として生体側に認識されやすいと思われるパラメーターを多くもつペプチド40数カ所をコンピューター解析により予測選出し、これらの部分ペプチドをF-moc固相合成法により純化学的に試作した。

これらのペプチドを口蹄疫診断用の抗原として、非特異反応が低くかつ感度の高い抗体検出が行えるか否かを現在でも口蹄疫の発生があるタイ国の口蹄疫センターにおいて口蹄疫に実験感染させた陽性血清を用いて検討を行った。なお、同センターにはO型、Asia-1型及びA型の3種類の陽性血清のみしか持ち合わせがないため、残る4種類の即ちC型、SAT-1型、SAT-2型及びSAT-3型を含む7種類の血清型に対する陽性抗体を用いたペプチドの評価は、英国パーブライト動物疾病研究所において実施した。

4. 成果の概要

作成したペプチドは、そのまま単体で、ま

た、家兎及び馬グロブリンと分子数（モル）比で50:1の割合に共有結合させたものについて検討したところ、馬グロブリン結合物がもっとも優れた反応を示したので、以後は馬グロブリン結合物を用いた実験を行った。

間接酵素抗体法（間接ELISA法、以下単にELISAと略記する）で、合成したペプチドのうちもっとも優れた反応を示したものは#7及び#10の2つのペプチド（図1に下線で示す）であった。前者は13個のアミノ酸Arg-Ser-Thr-Pro-Glu-Asp-Leu-Glu-Arg-Ala-Glu-Lys-Glnの配列を有する2B由来のペプチドで、後者は18個のアミノ酸よりなるLeu-Glu-Lys-Gln-Arg-Asp-Leu-Asn-Asp-Pro-Ser(or Gly)-Cys-Tyr-Lys-Glu-Ala-Lysの配列を持つ2C由来のペプチドであった。これらの2種類のペプチド#7,#10の陽性血清との反応を天然の3D蛋白と共に図2に示す。陽性対照とした天然3D部分精製蛋白抗原では、1:20血清希釈時で1.17のOD値が得られた。一方、OD値が0.5の希釈を比較すると、ペプチド#10及び#7では天然の3Dに比べて数百倍～数千倍の高い抗原活性が認められた。#7と10以外の試作ペプチドでは、高いもの数種類に天然の3D蛋白とほぼ同程度の反応が認められた。

図3には、実験感染を行った#1（血清希釈1:100）及び2（同1:600）の実験供試牛の感染経過血清について、抗原にペプチド#7を用いたELISAでのOD値の推移を示す。何れの感染牛でも、ほぼ同様な推移で感染2週間後から有意な抗体の上昇が認められ、感染16週後の最終採血時点でもかなり高い値を維持していた。

以上の結果より、#7ペプチドはELISAにより従来の天然の3D蛋白質抗原の千～2千倍を越える高感度の測定系が開発可能な極めて優れた人工抗原であることが明らかとなった。

ペプチド#7について、口蹄疫診断用抗原としての有用性（異なる血清型との反応性、感染抗体とワクチン抗体、抗原の保存安定性など）を検討した。O型以外の6種類の異なる血清型の口蹄疫ウイルスに感染した牛の血

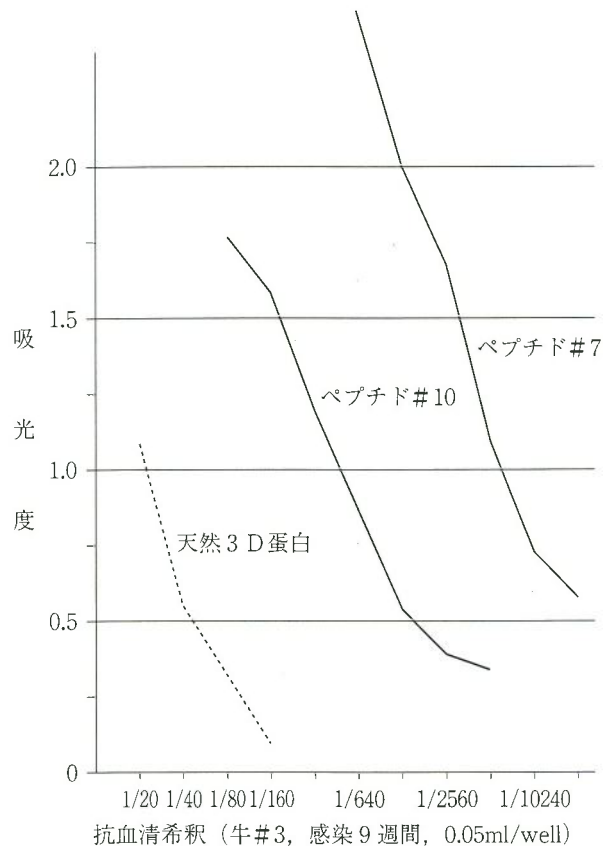


図2 口蹄疫感染牛陽性血清との反応

清においても、ホモなO型感染血清とほぼ同じ反応を示すことが確認され、この抗原は口蹄疫ウイルスの群共通な特異抗原であることが明らかとなった。また、ワクチン接種を行った牛の血清では、感染症例とは異なり、極めて低い反応が見られた（図省略）。このことは、感染した牛と、ワクチン接種を行った非感染（ワクチン抗体陽性）牛とをこの抗体検出系において判別することが可能なことを意味しており、わが国のような清浄国での口

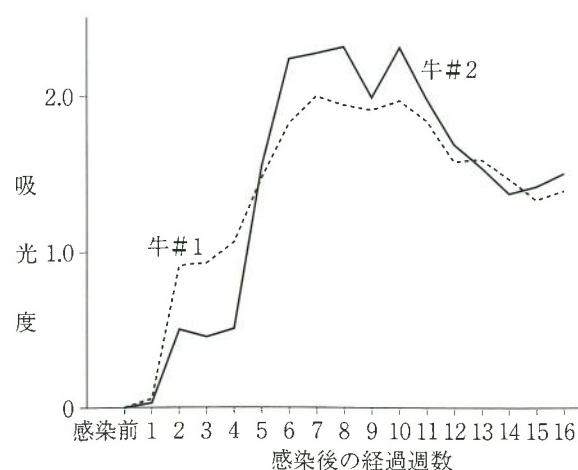


図3 口蹄疫感染動物の感染後の抗体価の推移

蹄疫の侵入防止に役立つのみならず、口蹄疫常在地域でのワクチン投与によって流行地域を徐々に狭めつつある状況下で、病気を拡げる（感染源となる）感染した動物の摘発にも極めて有用な武器となるものと考えられた。

また、抗原をコートしたELISAプレートの2ヶ年4℃下での保存においてもその抗原活性は全く変化しないことも確認され、この診断用抗原としてのペプチドは極めて安定性も高いことが明らかになった。

#7ペプチドについての莫大な蛋白質データベースのアミノ酸の相同性検索を行った結果、口蹄疫ウイルス以外のウイルス等との相同性は極めて低いことも確認された。従って、このペプチド抗原を応用した口蹄疫特異抗体検出系を開発することにより、極めて高感度かつ、非特異反応の低い全ての血清型の口蹄疫ウイルス感染動物の検出法の確立が可能となるものと思われる。

5. おわりに・問題点など

ELISAによる口蹄疫ウイルスの非構造蛋白についての化学合成部分ペプチドの評価を行い、極めて優れた診断用の抗原として使用可能なペプチド2種類を見いだすことができた。これらの2種類のペプチドは、国内特許（特許年月日；平成10年8月14日，特許第2813768号，発明の名称；「口蹄疫診断用ペプチド及び当該ペプチドを含有する口蹄疫診断用抗原」として特許原簿に登録）及び、米国特許（1997年6月17日；特許番号:5639601，特許名:Synthetic peptide sequences useful in detection of foot and mouth disease）を取得済みである。

今回のペプチドのスクリーニングに用いた抗血清は典型的な感染をした動物のもので、実際の野外例では種々の段階の感染状態が考

えられるので、口蹄疫の国内侵入防止のため検疫業務等に実用化する前に偽反応等に付いて、多数の弱陽性を含む陽性～境界域～陰性血清を用いた詳細かつ慎重な検討を行うことが不可欠である。

現在全ての血清型の口蹄疫の診断に用いられている3D中間製精物を用いた寒天ゲル内沈降反応は比較的検出感度が低く、また感度の高い補体結合反応、液相ELISA法、中和反応等では、組み合わせの異なるヘテロな血清型の口蹄疫を診断する場合に診断が困難となることが考えられる。従って、今回見いだされたすべての7種類の血清型に共通な抗体を高い感度で検出する方法は、簡便であり、かつ非常に高い感染性を持つ口蹄疫ウイルスを用いる必要が無いため、極めて安全な診断法としての活用が期待される。

今回ペプチドの評価に用いたELISA法よりもさらに高感度な実験室的な特異抗体検出法である時間分解蛍光検出法や、野外で実験室なしで簡単に検査が可能な種々の凝集反応等に応用することにより、口蹄疫の侵入防止のみならず、流行地での疾病撲滅にも役立てることが可能となるものと思われる。

参考文献

- 1) ペプチド合成，合成化学シリーズ。泉屋信夫，加藤哲夫，大野素徳，青柳東彦著。丸善株式会社。
- 2) 家畜衛生に必要な免疫の概念と術式，技術の手引き11。日本獣医師会。
- 3) 酵素免疫測定法（第2版），石川榮治，河合忠，宮井 潔 編。医学書院。
- 4) Modrow, Use of synthetic peptides as diagnostic reagents in Virology (Immunochemistry of viruses, II. The basis for serodiagnosis and vaccines, (1990) Elsevier Science Publishers, Biomedical division, p.83-101.

地域の先端研究

黒毛和種種雄牛の体細胞クローン牛の作出

大分県畜産試験場

志賀 一穂

種雄牛（12及び14歳）の筋肉組織を採取して培養し体細胞を得た。この筋肉組織培養細胞を飢餓培養並びに飢餓培養せずに体細胞をドナー核としてレシーピエント卵子と融合させた。これらを体外培養により胚盤胞期の胚に发育させることができた。このクローン胚を借り腹牛に移植し、生存した子牛を得ることができた。

1. はじめに

核移植技術は同じ遺伝子を持つ動物（クローン）を生産する技術として、1983年 McGrathとSolter¹⁾がマウスの前核置換による核移植を報告して以来多くの核移植研究が行われてきた。家畜では1986年にヒツジの若い发育ステージの胚（8～16細胞）の割球をドナー核とし電気融合により子ヒツジの生産に成功した²⁾。ウシにおいては1987年同様の手法で成功している³⁾。これまでに使われたドナー核（細胞）は将来どの組織になるか未だ決定していない未分化な細胞を用いて行われてきた。そして、少ないドナー細胞を有効利用するため、核移植した卵子が核移植のドナー細胞として利用できるステージまで发育したものを再びドナー細胞として利用する継代核移植によりクローン胚の増産を行っている。しかし、この継代核移植は数代では可能であるが何代もできるとは限らない。昨年（1997年）イギリスロスリン研究所から分化した体細胞（乳腺細胞）を使ってクローンヒツジ「ドリー」が誕生していることが発表された⁴⁾。これまで両生類での体細胞核移植の成功は知られていたが、哺乳動物では分化した細胞をドナー細胞として核移植を行うことは不可能と思われていた。

私たちはこの体細胞核移植が1988年8月から種雄牛のコピー牛を作成すべき体細胞核移植の実験に取り組み産子を得たので紹介する。

SHIGA Kazuho

2. 体細胞の採取・培養・保存の方法

体細胞核移植に用いる体細胞を準備するため、種雄牛の胸最長筋をバイオプシーして筋肉組織を採取した。採取した組織をコラゲナーゼtype Iで分散させ、39℃、5%CO₂、95%空気の湿潤気相下で10%牛胎児血清加DMEM培養液によって培養増殖させた。培養フラスコの底全体に細胞が増殖したもの（コンフルエント）をトリプシンにより細胞を単離し、新しい培養液の入ったフラスコに植え継ぎ（継代）、更に細胞を増やした。増えた細胞の一部を核移植用として継代培養し、残りは20%子牛血清加ダルベッコのPBSで作成した10%のエチレングリコール液を使い、0.25mlプラスチックストローに詰めて凍結し、何時でも細胞が使えるように保存している。

3. 受核卵子の処理

ドナー細胞と融合させる受核卵子は、屠場で屠殺された雌牛の卵巣を実験室に持ち帰り、卵巣中の1～4mm径の卵胞に注射器で未成熟卵子を吸引採取した。顆粒膜細胞に包まれた卵子を選別し、成熟用培養液（5%子牛血清加TCM199）で20～21時間成熟培養し、ヒアルロニダーゼを使って裸化卵子にして第1極体を有する成熟卵子（卵母細胞）を選別した。この成熟卵子は核（n）を持っている。この核を除去するため5μg/mlのサイトカラ

シンBを含む培養液中で核が存在する第1極体の近くにある細胞質を第1極体と共に透明帯外へ押し出して除去（除核）した。

4. ドナー体細胞の核移植 (融合) 前の処理

クローン羊「ドリー」の誕生は、用いた乳腺細胞を細胞周期のG0期に誘導し、核の初期化を起し易い状況の細胞にしたことで成功につながったといわれた。細胞周期とは1個の細胞が2個に分裂増殖する間の周期であり、分裂期のM期、分裂のためにDNA合成を行うS期、M期とS期の間期をG1期 (gap1)、S期とM期の間期をG2期と呼び、M期からG1期そしてS期、G2期のサイクルを繰り返して分裂している。そして培養液中の栄養成分の制限やタンパク質阻害剤を添加することにより、G1期から次の周期のステージS期に進むことができなくなり周期が止まってしまう。この時期のものを休止期またはG0期と呼ばれている。このG0期に誘導するためにドリー作出と同様の飢餓培養、即ち0.5%の牛胎児血清加D-MEMの低栄養培養液で5日間培養したものと飢餓培養なしで10%濃度の

血清を加えた培養液で培養した細胞の2処理のドナー細胞を使った。これらの細胞による核移植後の胚盤胞期への胚の発生状況を調べた。なお、細胞融合はZimmermann Cell Fusion Medium中で0.8kV/cm, 50 μ sec.の直流電流を2回印加して行った。

5. 体細胞による核移植後の 胚盤胞発生状況

表1に筋肉組織の培養細胞由来体細胞核移植の成績を示した。A, B区は飢餓培養したドナー体細胞をC区は飢餓培養無しで供与した成績である。また、A区はレシーピエント卵子を融合前に活性化処理し、B, C区は融合後に活性化処理を行った。A区の処理は通常受精卵の割球（胚細胞）をドナー細胞として核移植をする時に行う活性化処理方法である。A区の融合率・分割率は高いがその後の発育が悪く胚盤胞まで発育した割合はわずか3%と低率であった。しかし、融合後に活性化処理したB, C区は融合率はA区に比べ悪かったが、融合卵子の胚盤胞への発生割合が高く、また、B, C区の飢餓培養の有無での胚盤胞発生割合に差が見られなかった。この結果、体細胞の核移植では融合後に活性化処理する方法が最適であり、飢餓培養をしていない細胞で移植可能なクローン胚の作成ができることが明らかとなった。

この飢餓培養なしで胚盤胞までの発生が可能であった理由については詳細に検討していない。牛の胎児繊維芽細胞を使ってトランスジェニック子牛を作ったCibelliら⁵⁾も飢餓培養なしで行っている。彼らは発育の速い胎児繊維芽細胞を使うことにより、G1期の細胞がより多く存在することで飢餓培養を実施しなかった。細胞によってセルサイクルの時間が異なる。増殖の速い細胞（例えば24時間で1サイクルする細胞）での細胞周期のどの時期にあるかをこの細胞のDNA量の違いによってセルソーターを使って調べるとG1期の細胞数はS, G2, M期を合わせた量の2倍以上あり、細胞周期の各期の中でG1期に

表2 体細胞をドナー細胞とした核移植成績

処理区	供試個数	融合個数 (%)	分割個数 (%)	胚盤胞発生個数 (%)
A区	157	124 (79.0)	87 (70.2)	4 (3.2) ^b
B区	117	75 (64.1)	66 (88.0)	24 (36.4) ^a
C区	137	75 (54.7)	64 (85.3)	26 (34.7) ^a

*異符号間に有意差 (χ^2 検定 P<0.05)

表2 体細胞クローン胚の移植成績

区分	移植胚数	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)	流産頭数
新鮮胚	1	7	2	28.6	1
	2	4	3	75.0	2
凍結胚	1	7	3	42.8	1
	2	2	0	0	-
計		20	8	40.0	4

に一番長い時間いることが分かっている。このことは、通常の培養を行えば何時でも半分以上はG1期の細胞が存在する。加えて、細胞を培養フラスコの全面に広がったコンフルエントな状況におくと分裂を停止する（密度依存性細胞分裂阻止）。細胞は休止期と同様の状況におかれる。このような理由で飢餓培養することなく通常の培養中の細胞を核移植のドナー細胞として利用できるものと考えられる。

6. クローン胚の移植と分娩成績

表2に発生したクローン胚の移植成績を示した。新鮮胚、凍結クローン胚を延べ20頭に移植し8頭が受胎した。しかしながら、8頭の受胎牛の内4頭が胎齢50～60日で流産した。流産した4頭は同じ種雄牛由来のもので実験継代6代目と10代目での実験で作成したクローン胚によるものであった。受胎を継続した4頭の全てが子牛を出産した。受胎牛の腹囲から過大な胎児がいることを予測し2頭は分娩予定日前2～4週間前に分娩誘起処理を行ったが分娩に至らず帝王切開によって取り出した。2頭は分娩予定日まで待ち、1頭は自然分娩、1頭は帝王切開で出産させた。これら4頭の体重は約41～44Kgで、通常の産子の平均生時体重31Kgを10Kg以上うまわっていた。そして、2頭はウイルス感染と思われる四肢の伸縮異常が見られた（IgG抗体価の上昇、アカバネ、アイノウイルス中和抗体

陽性）。また、1頭は正常な体で出産したが40分後に急に呼吸不全に陥り死亡した。1頭はつい最近生まれ現在の所正常な発育を行っている。このようにクローン胚移植により生存した産子を得ることができた。これらの子牛と用いた細胞そして採取した種雄牛の血液から得たDNAを使い、23種のDNAマーカーによるクローン判定を動物遺伝研究所に依頼した結果、子牛、種雄牛、細胞の3者が矛盾せず一致しており4頭ともクローン牛と判定された。

7. クローン子牛の生産の課題

上記のように現在のクローン牛の生産における問題点がいくつかある。まず流産が多いことである。我々の所だけでなく他の体細胞クローン胚移植を行っている場所でも同様である。通常の人工授精では約4%前後、体内受精卵移植で8%前後の発生があり、核移植胚ではその2倍から3倍以上発生している。前述のように同じロットでの流産は核移植実験中の何らかの問題点の存在を示唆していると思われるが、未だ移植頭数も少なく移植例が増えた状況でその原因究明も可能となるものと思われる。また、受胎牛のお腹で胎児が異常発育し、難産等を起こし易くなることも問題となっている。これは核移植のみでなく体外受精胚の移植でも観察されている。手軽にできる体外培養系に問題があると思われ、今後は血清等に含まれる成長因子等の影響を



写真1 生れて1週間目の体細胞クローン4号牛

避けるため無血清培養液などへの改善が必要である。今回分娩した借腹牛とクローン子牛はたまたま本年流行し今一般の牛にも発生しているウイルス性疾患に罹患していた。今後は借り腹牛には予防ワクチン接種で防止できる疾病に対して万全の処置を行い移植することになっている。

8. おわりに

牛の体細胞核移植に用いる細胞は我々が行った筋肉組織培養由来細胞を始めとして卵管上皮細胞, 耳上皮培養由来細胞, 子宮灌流液からの上皮細胞及び初乳中の体細胞から核移植クローン胚の受胎例や子牛の生産例が発表されている。この技術が農家の牛に適用できるまでに前記のようにまだ幾つかの難問が残っている。これらの技術改善を図ると共に生産された子牛が細胞採取した牛やクローン牛

間の能力が同じであるかなども調査しなければならない。

文献

- 1) Macgrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 1983; 220: 1300-1302
- 2) Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986; 320: 63-65
- 3) Prathe RS, Bames FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL. Nuclear transplantation in the bovine embryos: assesment of donor nuclei and recipient oocytes. *Bio Reprod* 1987; 37: 859-866
- 4) Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ & Campbell KHS Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 358: 810-813
- 5) Cibell JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blakwell C, Abel Ponce du Leon F, Robl JM, Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; 280: 1256-1258

文献情報

組換え遺伝子が周辺に広がる危険性は低い

ヨーロッパにおいても、遺伝子組換えナタネが商業化される段階に至り、組換え遺伝子が野生の近縁種に移行するのではないかと心配されている。しかし本報告で著者らが行った以下の調査から、組換え遺伝子が周辺に広がる可能性は低く不確実であることが判った。

栽培ナタネである*Brassica napus*と近縁野生種である*B.rapa*とは混植状態で9~93%あるいは3~60%の雑種を作ることが認められているので、*B.rapa*は組換えナタネから導入遺伝子が移行され易い近縁野生種であると言える。

組換え遺伝子が近縁野生種に移行する可能性は、野生種の群落が大農場に隣接している場合に最大となるだろう。そこで、第一の調査はテムズ河沿いにある2つの*B.napus*の農場のすぐ近くにある*B.rapa*の群落について行われた。第1調査地点(Berk州, Hambleden Lock)では1996年に15haの農地に栽培された*B.napus*から5m以内に50株の*B.rapa*が生育していた。第2調査地点(Oxford州, Culham)では1997年に、12haの*B.napus*農地の1~2mの範囲に350株の*B.rapa*が生育していた。

Hambleden試験地から収集した13,341個の種子のうち57%の7,594個が発芽し、そのうちわずか0.4%の30株だけが雑種であった。Culham試験地から収集した2,000個の種子中53%の1,053個が発芽し、1.5%の16株が雑種であった。さらに、雑種としての表現型を示さなかった個体を無作為に抽出し、フローサイトメトリーとInter-SSR PCRで調査した結果、いずれも雑種ではなく*B.rapa*であった。

第二の調査としてテムズ河沿いの33.4kmにわたり*B.rapa*群落の分布状況を調査した。Oilseed rape農地から360m以内に隣接し、10~1,000株の*B.rapa*が生育する群落は、調査145群落の7%以下であった。360m以上離れた地点でのOilseed rapeの浮遊花粉密度は農場の縁の密度の10%以下であった。従って組換え遺伝子が野生種に移行する危険は全くないとは言えないが7%以下の群落で低い頻度であるのみである。

第三の調査は群落内の個体の生存率についてである。子葉~第1本葉期の苗が結実まで生存する確率は2%以下であり、殆どが虫害などにより消滅していることがわかった。

著者らの結果を一般に適用すると、導入遺

伝子をもち開花期まで達した雑種植物が、自然界の*B.rapa*群落内に生ずる割合は小さいと推定される。すなわち、全群落の7%以下の群落で、0.4~1.5%の雑種種子が生じ、その生存率は2%以下であるので、 $5.6 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^5$ 以下の頻度となる。

以上の結果、遺伝子組換えにより作物に導入された遺伝子は、著しく選抜上の有利な特性を持つものでない限り、周辺の野生種に移行することは非常にゆっくりでありしかも不確実であると言える。このことは植物における遺伝子組換えが自然の植生を変化させる可能性は実際のフィールドでは小さいことを示すもので注目される。

(抄訳 平岡慈美—東京テクニカルカレッジ
環境テクノロジー科)
(HIRAOKA Megumi)

Transgene risk is low.

Susan E. Scott and Mike J. Wilkinson
Nature Vol. 393 : 320 1998

文献情報

マウス体細胞の核移植によるクローン個体の作出

培養細胞の核を移植して個体を得るクローン作出法の成功がヒツジやウシで報告されている。マウスは、ES細胞を用いたノックアウトマウスの作出により、様々な遺伝子機能の解明など、発生生物学的にも最も多用され、多くの研究結果の蓄積があるにもかかわらず、培養細胞核の核移植によるクローンの作出は不可能であった。Wakayamaらは卵丘細胞の核を移植することで、クローンマウスの作出に成功したことを報告している。

ヒツジの体細胞クローンでは、移植する細胞の細胞周期をG0またはG1にすることで成功していることから、彼らはG0またはG1にあることが知られている性成熟したマウスのセルトリ細胞、神経細胞、卵丘細胞を用いた。採取した細胞は培養せず、直ちに核移植に使用した。核を卵細胞質に注入後、ストロンチウムとサイトカラシンBを含む培養液で活性化した。卵丘細胞を注入移植したところ、64%が2個の偽前核を示し、うち85%が正常2nマウスの染色体数である40本の染色体を有していた。注入直後に活性化するよりも注入後1-6時間後に活性化する方が、その後の桑実期/胚盤胞期に58-67%と高率に発生した。セルトリ細胞、神経細胞を同様の方法で移植し、1-6時間後に活性化したとこ

ろ、それぞれ40%、22%が桑実期／胚盤胞期に発生した。

卵丘細胞を注入して得た800個の再構築胚を54匹の雌マウスに胚移植を行い、妊娠18.5-19.5日で帝王切開したところ、17匹の生存胎仔が得られた。そのうち6匹はすぐに死亡し、1匹が出産7日目に死亡したが、残りの10匹は生存し正常に発育した。これらの雌マウスは‘Cumulina’と名付けられた。Cumulinaを雄と交配させると正常な産仔が得られ、正常な生殖能力を有していた。毛色が遺伝的に異なるマウスを用い同様の実験を行ったところ、同様に産仔が得られた。一方、セルトリ細胞を注入して得た59個の桑実期／胚盤胞期胚を胚移植したところ、1匹は妊娠8.5日まで生存していた。また、神経細胞を注入して得た46個の桑実期／胚盤胞期胚を胚移植したところ、妊娠6-7日で全てが死亡した。

卵丘細胞で産仔が得られ、セルトリ細胞、神経細胞では産仔が得られなかった理由は明らかではないが、ドナー核がG0にあるだけでは不十分である可能性がある。胚移植後の着床率が57-71%と高いのに対して、胎仔には5-16%、産仔には2-3%と低くなることから、着床後に何らかの因子やチェックポイントが働いている可能性がある。マウスの体細胞クローンの成功は、体細胞ゲノムの再プログラム化、ゲノムインプリンティング、胚性ゲノムの発現、細胞増殖といった発生生物学的現象の分子レベルのメカニズムを解明していくのに大きく貢献するであろう。

(抄訳 松本浩道—東北大農)
(MATSUMOTO Hiromichi)

Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei

Wakayama T., Perry A.C.F., Zuccotti M., Jhonson K.R. and R. Yanagimachi
Nature, 394 : 369-37423 July, 1998

文献情報

ガス型植物ホルモン・エチレンの細胞内シグナル伝達機構

エチレンガスがバナナを成熟させるのに使われていることをご存知の方は多いと思われるが、エチレンガスは果実の成熟のほか、器官脱離や老化の促進など多面的な生理作用を持つ歴とした植物ホルモンである。近年、分子遺伝学の急速な発展に伴いエチレンのシグ

ナル伝達機構が解析され、現在までにヒスチジンキナーゼ活性を持つ膜結合型受容体(ETR 1, ETR 2, EIN 4, ERS 1, ERS 2), RAF型キナーゼ(CTR 1), 核内タンパク質(EIN 3)などがクローニングされてきた。

報告の中で筆者らは受容体遺伝子の変異が全て優性変異であるという事実に端を発し、(1)全ての受容体がエチレンのシグナル伝達に関わるのか?(2)受容体はエチレンを正負、どちらの信号として捉えているか? という問題提起のもとに研究を行った。まず優性変異体から復帰突然変異体を探すという手法で受容体遺伝子の劣性変異(loss of function mutation: 遺伝子の機能を消失した変異)を選抜した。得られた復帰変異体は、見かけ上、野生型と全く同じエチレン反応を見せた。このことは初期の研究において受容体の劣性変異が得られなかった理由をよく示すとともに、受容体遺伝子群が冗長性(代わりに機能を果たす代行能力を備えること)を持って配置されていることを示唆する。

続いて筆者らはこれらの多重変異体を作り、エチレンに対する反応性を調べた。その結果、四重変異体(*etr1-6, etr2-3, ein4-4, ers2-3*)や一部の三重変異体(*etr1-6, etr2-3, ein4-4*)ではエチレンが存在しなくともエチレン反応が見られた。このことはエチレンが負の信号として働き、受容体を不活性化させることでエチレン反応が進行すること、すなわちエチレン非存在下で受容体は活性化状態にあり、下流の反応を阻止するよう働いていることを示している。通常、動物のホルモンや成長因子は受容体を活性化させることで反応を進行させるが、エチレンの場合は全く逆であるという点で大変興味深い。何故、このように調節されているのであろうか? 筆者らはエチレンの関わる多くの現象がストレス反応であることを第1の理由に挙げている。このような場合、受容体が複数存在してそれらが順次不活性化を受けることで反応が進むほうが有利であると述べている。納得できる理由であるが、排気ガス、工場の煙ほか微生物もエチレンを作りうるので、植物がエチレンに偶然遭遇する機会も多いと思われる。こう云ったこともエチレン反応が負の制御を受ける理由になるのでは無からうか?

本報告で示されたユニークな認識機構はガス型植物ホルモン・エチレンの生理学的意味を理解していく上で重要なヒントを与えるものと思われる。今後、この発見を契機にシグナル伝達機構がより詳しく解明され、得られた知見が農業ヘフィードバックされることが

期待される。

(抄訳 岡本繁久—鹿児島大学農学部)
(OKAMOTO Shigehisa)

Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*

Jian Hua and Elliot M. Meyerowitz
Cell, 94: 261-271, 1998

文献情報

**ケイ藻のケイ酸塩消費量比率
に対する鉄の影響**

世界中の外洋の表層水で、植物プランクトンに必要な光と栄養素がほぼ満たされているにもかかわらず、植物プランクトンの生育量が少ない海域が多くある。これらの海域での植物プランクトンの生育量を制限する要因は、微量栄養素である鉄の欠乏であることが、Coaleら(*Nature*, 383: 495-501, 1996)によって、太平洋赤道海域で実証された。

Takeda は、太平洋の南部海域(南緯 64.2 度)、赤道海域、亜寒帯海域(北緯 45 度)の植物プランクトンと海水を用いて、鉄による制限が、植物プランクトンの生育だけでなく、硝酸塩やリン酸塩に対するケイ酸塩の消費量比率にも影響を与えることを示している。Takeda は、この 3 海域の海水に鉄を添加して、内在する植物プランクトンを 7 日間培養した。すると植物プランクトンの増殖が大きく促進され、これに伴って海水中の硝酸塩やリン酸塩の濃度の減少速度は大きくなったが、ケイ酸塩の濃度の減少速度は鉄を添加しなかったものと比較して大きく変化しなかった。つまり、鉄を添加することによって、ケイ酸塩のみ他の栄養素に対する消費量比率が小さくなったと考えられる結果であり、ケイ酸塩消費量比率は鉄を添加しなかったものに対して 1/2 ~ 1/3 程度であった。顕微鏡観察によると、鉄添加の有無にかかわらず植物プランクトンの種類はほぼ同じで、多くが大型ケイ藻の *Chaetoceros* spp. と *Nitzschia* spp. であった。なお、光量を通常の 2.6% に制限した場合でもケイ酸塩消費量比率は同様の結果となり、光合成が行われる限度近くの深さの領域までこの現象が起こると考えられる結果であった。

また、南太平洋の海水から単離したケイ藻

Chaetoceros dichchaeta と *Nitzschia* sp. をこの海域の海水を濾過したもので純粋培養したところ、ケイ酸塩消費量比率は、どちらも鉄を添加した海水(鉄濃度 2.1 nM) で培養したものが無添加のもの(鉄濃度 1.3 nM) の半分程度であり、それぞれの細胞においてケイ素の窒素やリンに対する組成比率も鉄添加によって半分程度となった。つまり、鉄が豊富であれば、ケイ藻の殻は薄くなるということである。

ケイ藻のケイ素含有比率が鉄の量によって大きく異なるということは、今後の地球生物化学に大きな影響を与えるかもしれない。海洋の大陸棚のオパール堆積層は水和した SiO₂ 重合体からなり、ケイ藻の死骸などが堆積してできたもので、過去の海洋における生物量を見積もる目安として利用されている。本報で得られた知見は、この方法が偏向している可能性を示唆するものである。というのは、ケイ酸分含量の少ないケイ藻の死骸は比重が小さく、海底への沈降が比較的遅いので、捕食や分解を受ける比率が高くなって、細胞内での含有比率の差よりもさらに大きな差となってオパール堆積量が少なくなる可能性が考えられるからである。

氷河期には、現在や間氷期と比較して、大気中の塵(陸地から風で巻き上げられた砂などで鉄分を含む)が多く、温暖化効果のある CO₂ 濃度が低かったことが明らかになっている。そこで、氷河期には大気から供給された鉄により増殖した植物プランクトンにより CO₂ が大量に消費されて減少したという説がある(*Nature*, 378: 675-680, 1995)。海洋で消費される CO₂ 量は陸上よりも多いといわれているが、氷河期のオパール堆積量は、当時の CO₂ 濃度減少を説明できるほど多くの生物量を表していないという見方があった。しかしながら本報で得られた知見は、オパール堆積量が現在の推定よりも更に多くの生物量を示す可能性を示唆するものであり、今後の議論を期待したい。

(抄訳 土田 貴正—マルハ(株)中研)
(TSUCHIDA Takamasa)

Influence of iron availability on nutrient consumption ratio of diatoms in oceanic waters
Shigenobu Takeda

Nature, 393: 774-777, June 25, 1998

海外便り

馬伝染性貧血—遺伝子の変異領域の解析及び 本疾病診断法の国際的統一基準の検討— —米国農務省・国立獣医診断研究所での3ヶ月—

農林水産省 家畜衛生試験場
泉対 博

1997年3月上旬から3ヶ月間、米国農務省・国立獣医診断研究所（U.S. Department of Agriculture, National Veterinary Service Laboratories, 以下NVSLと略す）に科学技術庁中期在外研究員として滞在する機会を得た。NVSLのあるAmes市はアイオワ州の州都Des Moinesから約60Km北にある、アイオワ州立大学を中心とした人口約5万人の学園都市である。郊外に出ると、とうもろこし、麦、牧草などの農地がちらり、空気は澄んでいて、ちょうどそのころ地球に接近していたハールボップ彗星がきれいに見えた。農務省の研究機関はAmes市の繁華街や商店街から2-3マイル離れており、NVSLと家畜疾病研究所(Animal Disease Center)が隣接して設置されている。私がお世話になったNVSLのウイルス診断研究室(Diagnostic Virology Laboratory)は高度隔離施設で、シャワーを浴び衣類を全部着替えて入室しなければならない。

1. 馬伝染性貧血ウイルス遺伝子の変異領域の解析

私の日本の研究室は、科学技術庁振興調整費による総合研究、「エイズ等感染・発病制御のための基盤技術の開発に関する研究」の「エイズウイルス感染・発症モデル動物系の開発に関する研究班」に加わっており、馬伝染性貧血ウイルス(EIAV)を使用したエイズウイルスの感染モデル系を開発する研究課題を担当していた。日本での一連の研究で、EIAV実験感染馬から経時的に分離した変異ウイルスの表面蛋白構成部の遺伝子について塩基配列を調べ、特定の部位に挿入や欠損が生じることを発見していたので、その部分の立体構造についてコンピューター解析を行い、こうした変異の生ずる原因を検索した。コンピューター解析は、Ames市内にあるアイオワ州立大学獣医学部のDr. S. Carpenter及びその研究室員の協力を得て行った。立体画像から、EIAVの変異が生じやすい遺伝子部位にいくつかのループ構造が形成されており、

SENTSUI Hiroshi

C-DNAを合成する際にその部分を飛ばしたり、重複して複製することにより、塩基の欠損や付加が生ずる可能性が示唆された。彼らが研究対象としている牛由来のレンチウイルスの遺伝子構造と比較したところ、両者の表面蛋白構成部の遺伝子が類似した立体構造を持っていることが示された。しかし、こうしたコンピューター解析は、遺伝子の塩基配列のどの部分からコンピューターに入力していくかで異なった立体構造を表示してしまう。コンピューターで示されたループ構造が実際のウイルス遺伝子でも形成されていることを確認する必要がある。

2. 馬伝染性貧血ウイルス病診断法の国際的統一基準の検討

家畜衛生試験場は世界で初めてEIAVの*in vitro*での培養に成功し、EIAVが抗原変異を繰り返して持続感染をするメカニズムを発見するなど、馬伝染性貧血の研究で世界をリードしてきた。現在、日本国内にはこの病気の発生がなくなり、研究規模も縮小されている

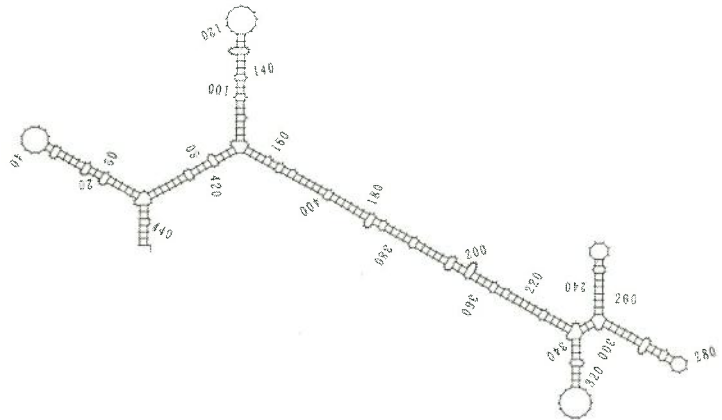
が、Office International des Epizooties (OIE) から馬伝染性貧血病の reference laboratory に指定されており、外国からの本疾病の診断依頼に対応したり、診断用抗原や血清を提供することが義務づけられている。NVSLも馬伝染性貧血病の reference laboratory に指定されており、両機関で行っている診断手法を比較することも、今回の出張のひとつの目的であった。

米国では他の州へ移動する馬はEIAVの抗体検査が義務づけられるため、かなりの数の検査用馬血清がNVSLに定期的に搬入される。それらを使用して、OIEで標準診断法に指定されている免疫拡散試験によりEIAVの抗体検査を行った。現在日本で使用している標準抗原、バキュロウイルスにEIAVのコア蛋白遺伝子を組込んで製造した抗原、NVSLで使用している抗原を、それぞれ使用して診断結果を比較検討をした。それらの診断結果はほぼ100%の一致が見られた。しかしより感度の高い酵素抗体法とこれら免疫拡散試験の診断結果との間には、2%程度の違いが見られた。米国では酵素抗体法による検査を補助診断法として使用し、陽性検体はWestern blotting で特異抗体であることを確認することで、免疫拡散試験では検出できなかった微弱陽性例を摘発していく方針を取っている。今後、国際間でEIAVの診断法をより感度の高いものへと改良していく場合、酵素抗体法による診断を検討していく必要がある。

米国の南部の州にEIAV抗体の微弱陽性馬が存在する。この原因は馬の免疫能によるものか特殊なウイルス株の感染によるものかを調べるため、微弱陽性馬の抹消白血球からPCR法によるEIAV遺伝子の増幅を試みたが、陽性反応は認められなかった。

3. NVSLの紹介

NVSLは米国農務省直轄の動物疾病診断機関で、6部門から構成され、その中の海外伝染病を担当する部門は、ニューヨーク州プラムアイルランド島に置かれている。私の滞在



馬伝染性ウイルスP337-V70株のenv領域の塩基配列から推測される遺伝子の立体構造。右端の230~340の部分が高率に変異が生ずる部分。Dr.Yuxing Li (Iowa State Univ.)の協力により作製。

した1997年3月時点の職員数は190名（プラムアイルランド島の部門を含む）、研究員数は58名で、内訳は獣医学25名、微生物学24名、化学3名、生物学5名、昆虫学1名であった。その他に、行政担当14名、研究補助者63名、動物飼育員17名、秘書・事務員18名、実験室維持管理（滅菌・洗浄業務、実験室清掃など）20名で構成されていた。1996年度の研究調査予算の総額は1,340万米ドル（人件費を含む）で、主な活動は、①家畜疾病の診断方法の研究・開発、②州および外国政府と連絡・共同のもとに家畜・家禽衛生の維持、③米国内で発生した動物疾病の診断、輸入動物の検疫、④動物医薬品の検査などの、米国農務省の家畜衛生プログラムの推進である。

4. 雑感

米国は日本と比べ様々な悪性家畜伝染病（狂犬病、馬のウイルス性脳炎など）が今だに存在している。これは、野生動物が多いこと、国土が広い等の様々な原因があり、米国の家畜衛生行政が不十分なためとは言えない。しかし、各州が独立した状態にあり、合衆国政府の方針が徹底しないことも、家畜伝染病の制御を難しくしている一因だと思う。家畜衛生を維持していくことに限れば、中央政府の力が強い日本の制度の方が効率的であると感じた。

国際会議便り

奈良国際シンポジウム 「植物バイオテクノロジーは食糧危機、環境危機を救えるか」 に参加して

生物系特定産業技術研究推進機構

貝沼 圭二

序： 筆者は、一昨年来、OECD メガサイエンスフォーラム「地球規模の巨大科学の将来」の企画委員を務めさせて頂き、1998年3月スウェーデンにおいてワークショップを開催した際に、今後の地球規模の巨大科学の一つとして「土地利用と食糧生産」のケーススタディの企画をした。ワークショップの結果は、科学者から政策決定者へのメッセージとしてOECD各国の科学大臣を通じて将来の政策決定に役立てることを目的としている。

同時並行的に、「地球規模問題を解決に導く新たな国際共同研究開発のあり方に関する調査委員会」の委員長をつとめ、植物研究の重要性と我が国における研究者層の薄さの現状を分析し、2020-30年に向けて日本のリーダーシップで研究体制の強化が必要なことを日本科学技術振興財団より科学技術会議に報告した。

1998年夏以降、幾つかの植物バイオテクノロジーのシンポジウムが国内で開催され、それらに参加する機会を得た。9月に生研機構の基礎研究を担当している篠崎博士が主催する「植物シグナリングー環境ストレスに対する分子反応」、10月にこの報告を書いている奈良国際シンポジウム、11月に第12回トヨタコンファレンス「二十一世紀に迎える地球規模の危機に対する植物及び農業科学の挑戦」などである。

10月28-30奈良市において開催された上記シンポジウムは、山田康之学長を大会委員長として学術振興会、奈良先端大学院大学が主催したもので奈良公園にある奈良新公会堂を会場にして行われた。その時の印象を以下にまとめた。

第1セッションー食糧、環境の現状と植物科学の役割

このセッションは、本シンポジウムの導入部に当たり、人口、地球環境、食糧生産、土地利用などの現状と人類が直面している問題点を明らかにする部分であった。筆者は、最初の演者として「地球環境の現状ー人口、土地利用、食糧生産」というテーマで、2025年に向けた人口増加、農用地の拡大に向けての先進国、途上国が抱える問題等を解説した。さらに地球規模の国際農業研究機関であるCGIAR-Consultative Group on International Agricultural Research-の使命と活動状況また我が国が国際農業研究に参画するために新しく創設した国際農林水産業研究センターの国際研究の現状などについて報告した。近畿大

KAINUMA Keiji

学の渡辺教授及び米国Purdue大学のJanick教授は、植物遺伝資源の重要性と人類の食糧生産の中で果たしている役割を述べた。植物栽培の歴史が進む中で、多様性が著しく失われている現状が示された。地球上には350,000種の植物があり、そのうち可食性のものは80,000種あるという。さらに栽培植物に変わったものは150種という話であった。人類に利用されている植物の90%は30種に絞られ、食糧生産を考えたときには、米、トウモロコシ、小麦、ジャガイモの4種が50%を占めているという多様性の消失を数字で示した。日本国際生態研究センターの宮脇教授は、生態に合った林の再生の重要性を述べ、その土地に従来生育していた植物の種子を発芽させて植林をするという宮脇理論による国内外での林の再生の状況を発表した。

第2セッションー植物バイオテクノロジー

このセッションでは、植物バイオテクノロジーの先端研究の進歩と産業化の紹介が行われた。奈良先端大学の横田教授によるSuper RuBisCOの研究は、C4植物並の光合成能力を持つC3植物の創出を目指す研究であった。すでに耐熱性紅藻類 *Galdieria partita* のRuBisCOはdioxygenの識別率が通常の植物起源のRuBisCOに比較して3倍以上で且つ、炭酸ガスに対する親和性が2倍以上になるという結果が得られていた。RuBisCOの2残基のアミノ酸を変換することにより反応性は更に改良されることも報告された。すぐに実用的な意味と言うよりも光合成の基本的な部分の改変を目指す研究として興味深いものであった。このセッションではいくつかの報告があったが、興味を引かれたものに、カナダCalgary大学のMoloney教授によるナタネ種子のoil-body結合タンパク質Oleosinsを利用した各種タンパク質、ペプチドを蓄積させる研究があった。またOleosinのC末端、N末端の鎖長を延長して各種酵素を結合させる固定化酵素の基材として抗血液凝固酵素Hirudinを結合させた実験例などが示された。水油系の界面反応を利用する酵素バイオリクターの固定化基材として興味深いものと思われた。奈良先端大学の島本教授は、植物の細胞死の現象を利用した病気に抵抗性を持つ植物創生の研究を発表した。

先年紫のカーネーション“Moon Dust”をサントリー社との共同研究で世に送り出したオーストラリア Florigene社のCornish社長は、世界の切り花産業は、ドイツ、アメリカ、日本の三大市場を中心に35億ドルの規模に上ると意気軒昂な30代とも見える美人の経営者であった。各種の花の色を変換する仕事の戦略をスライドで説明した内容は、イソフラボン骨格の置換基導入の位置と植物の液胞pHの変化に合わせて花色を変えるという生化学、有機化学の基礎に忠実に従いながら遺伝子組み換え植物を作成していく過程が示され印象的であった。モンサント社のSha博士は組換え植物は1998年には5,000万ヘクタール



写真1 能舞台を演壇にした講演

の栽培面積に及んだ事を述べ、モンサント社の各種組換え体の特徴を解説した。

第3セッションー安全性の問題

農林水産省の田部井博士は、日本において遺伝子組換え体が圃場試験にいたるまでの各種ステップごとに環境に対する安全性確認を、自身の研究であるキュウリモザイクウイルス抵抗性のメロンの実験例をもとに説明した。具体的な数字に基づいた説明は、日本のガイドラインを理解する上でも非常に有意義であった。デンマークのRISO研究所のJorgensen博士は、生物環境学の立場から遺伝子組換え植物の遺伝子が他の野生類縁種に伝播する可能性について発表した。雄性不稔、油成分を変化したもの、除草剤、昆虫、耐性の植物についてナタネ、ニンジン、ライグラスが類縁種に対して遺伝子を移動する実験結果が示された。遺伝子移動の危険性は、その頻度と効果(植物に対する影響)の積で表現されていた。類縁種への遺伝子移動は、自然界でも頻



写真2 第1セッションで講演する筆者



写真3 討論風景

繁に起こる現象で、植物の進化の基本的なステップである。この発表から受けた印象は、遺伝子操作は、重要な技術ではあるが、科学者は奢ってはいけないという警告であったと思っている。カリフォルニア大学のLenaux教授は、植物バイオテクノロジーを農業に導入する場合の規制およびpublic perceptionについて米国の歴史を中心に述べた。科学者が前面に出て啓蒙運動を行ってきた米国の歴史は、現在我が国で問題になっている組換え体食品の表示の問題に対する一般消費者への啓蒙、教育について示唆に富むものであった。

第4セッションー植物と人間

このセッションは、これまでの科学に基づいた発表と一転して人間生活から見て先端ばかり目をむけないでもう一度昔を考えてみたらどうかという講演もあり興味深かった。

中国科学アカデミーのZhi-hong Xu博士は、中国における各種植物バイオテクノロジーの進歩の紹介をした。数年前に作られた野外試験のガイドライン制定前にすでに数百例の野外実験を行ってきた中国の研究の方向を知る意味においても大変興味深かった。武蔵野美術大学の石川教授は、水槽の中に水、砂、小

石、水草、小魚、細菌を閉じ込めた閉鎖系の“Microcosmos”を例にしながら、リサイクル系を上手に利用した江戸時代の生活を説明し、自然と調和した生活様式の重要性を述べた。今の生活を江戸時代に戻すことは不可能であるが、ひたすら新技術を追求する現代科学に対する一つの警鐘とも取れる講演であった。

後記

現在バイオテクノロジーのシンポジウムの多くが先端研究の競い合いの結果の発表を中心に行われているが、今回は、地球環境の現状の分析、その修復の可能性、先端基礎研究、応用研究の進歩と商業化、バイオテクノロジーの安全性、リスクの可能性、Public Perception,さらには、先端技術に対する警告を含めた話題が提供された。静かに落ち着いた佇まいの奈良公園の中で能舞台を演壇にしてのバイオテクノロジーの講演は、周囲の雰囲気と話題が隔たっているような感じがしたが、終わる頃にはスパンの長い、数十年先に危惧される人口、食糧問題をじっくり考えるためには素晴らしい場であったと参加者全員が思ったことであろう。駒嶺教授司会による総合討論の結論は、「バイオテクノロジーは地球規模の食糧危機を救える」という心強いものであった。植物バイオテクノロジー研究に課せられた期待は大きく、研究者の責任は益々重いものになった。

今回の企画は、先端研究の世界に入り込むととかく見えにくくなる周辺の問題点をもう一度考えてみるという立場から非常に意義深い企画のシンポジウムであったと思われる。組織委員会さらには準備及び当日のお世話をいただいた事務局に対し敬意と謝意を表する次第である。

編集後記

謹んで、新春のおよこびを申し上げます。本年も読者の皆様にとりまして、良い一年でありますよう、心よりお祈り申し上げます。

昨年9月には、1年半にわたって精力的に検討を行ってきた「食料・農業・農村基本問題調査会」答申が出されました。これを踏まえ、農林水産においても、12月に新たな農政改革の方向が打ち出されました。本年は新しい農業基本法を含め、様々な政策が具体化されていくことと考えます。

安全で、良質な食料を安定的に供給するという農林水産業や食品産業の役割は今後ますます

重要なものとなっていくことと思います。このような中で、バイオテクノロジーをはじめとする先端技術の役割はますます多種多様なものとなってきました。

今回は、先端技術の一つである、体細胞クローン技術にスポットを当ててみました。次号では、食物アレルギーについて検討をしていきたいと思えます。

BRAIN テクノニュースにつきまして、本年も、昨年同様引き続きご愛読いただけますようお願い申し上げます。 (原田 記)

ブレインテクノニュース (第71号)

平成11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

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリビル10F

TEL. 03-3459-6565 FAX. 03-3459-6566

編 集 (社)農林水産技術情報協会

〒103-0026 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

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 1999