

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

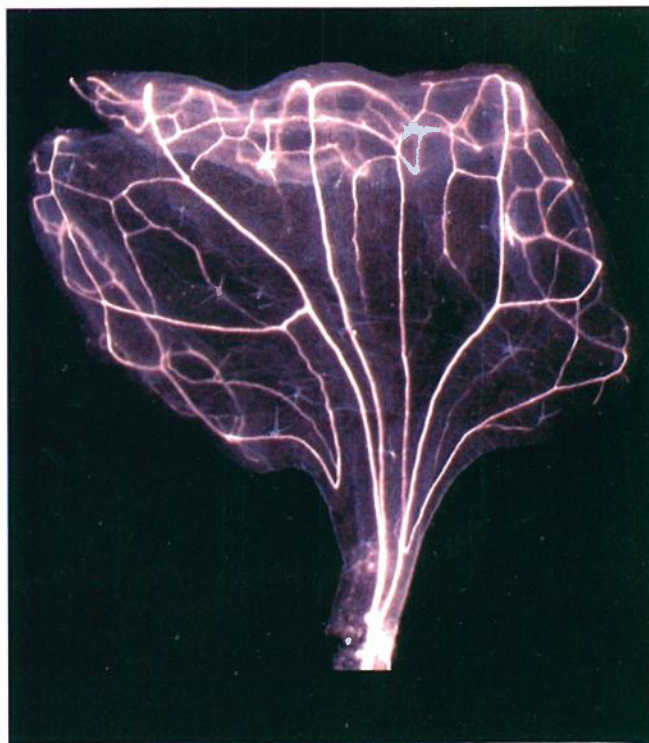
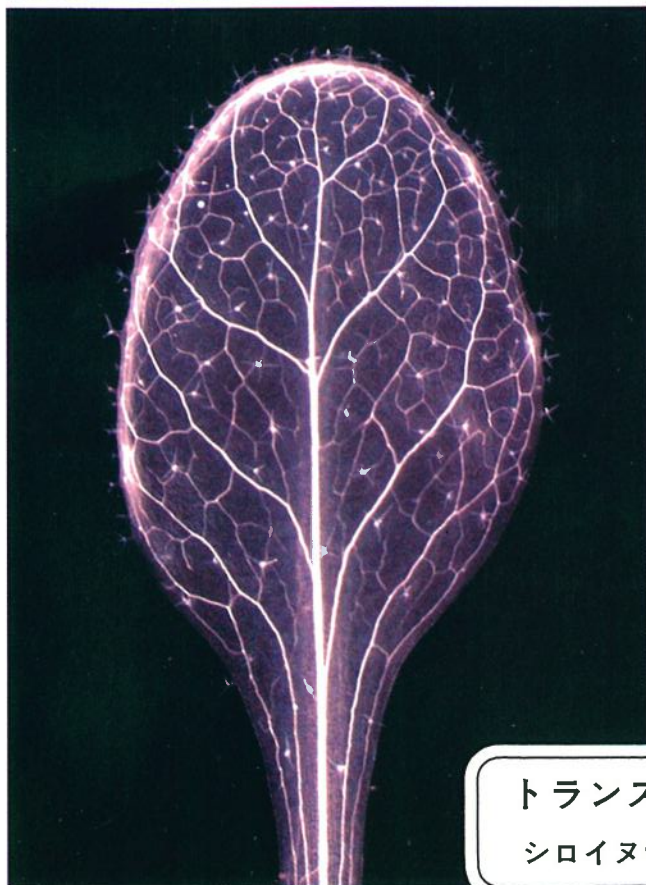
ブレインテクノニュース

第 78 号

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

MARCH 15, 2000



トランスポゾンによる植物遺伝子タギング法
シロイヌナズナの野生株 (左側) と *as 2* 変異体 (右側)

目 次

総 説	
DNA ワクチンテクノロジーへのサイトカイン遺伝子の応用研究は 21世紀の感染症克服に貢献できる……………	1
横溝祐一（農林水産省家畜衛生試験場）	
国内情報	
昆虫ウイルスを用いた家畜サイトカインの生産……………	6
犬丸茂樹（農林水産省家畜衛生試験場）	
サイトカインの動物臨床への応用……………	10
板倉敦子・松田浩珍（東京農工大学農学部附属家畜病院）	
抗アレルギー評価のためのヒト免疫担当細胞株の樹立……………	14
山本万里・川原浩治（農林水産省野菜・茶業試験場，北九州工業高等専門学校）	
トランスポゾンによる植物遺伝子タギング法の確立……………	18
町田千代子・田中博和・岩川秀和，町田泰則（名古屋大学大学院理学研究科）	
地域の先端研究	
薬剤を必要としない新規選抜マーカー遺伝子の開発—チャにおける利用—……………	24
丹羽康夫（静岡県立大学大学院食糧細胞工学研究室）	
文献情報	
卵細胞質内精子注入 (ICSI) 法による哺乳動物の遺伝子導入……………	29
Perry A. C. F. et al (Science, 284: 1180-1183, 1999)	
抄訳：木村直子（東北大学大学院）	
ミトコンドリア DNA は酵母染色体の二重鎖の破損を修復する……………	30
Ricchetti M. et al (Nature, 402: 96-100, 1999)	
抄訳：家藤治幸（国税庁醸造研究所）	
根粒の発達をコントロールする植物のレギュレーター……………	31
Schauser L. et al (Nature, 402: 191-195, 1999)	
抄訳：内海俊樹（鹿児島大学理学部）	
重篤なインスリン抵抗性，糖尿病および高血圧に関連するヒト PPAR γ の 遺伝子突然変異……………	32
Barroso I. et al (Nature, 402, 880-883, 1999)	
抄訳：室田一貴（マルハ(株)中央研究所）	
海外便り	
カイコにおけるレトロウイルスベクターの利用 —フランス・分子細胞遺伝学センターでの1年間……………	33
河本夏雄（農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所）	
特別情報	
BRAIN 国際テクノフォーラム—トウモロコシ育種の最前線—概要紹介……………	36
生研機構からのご案内	
基礎的研究開発促進事業（若手研究者支援型）課題， ならびに研究開発事業成果の紹介……………	39
平成12年度募集について……………	40

表紙写真説明

トランスポゾンによる植物遺伝子タギング法：左側はシロイヌナズナの野生株を，右側は *asymmetric leaves 2 (as 2)* 変異体を示す (Endang & Machida 原図)。上段は，播種後16日目の植物体で，変異体の葉の左右相称性に異常が認められる。また，下段は，播種後23日目のロゼット葉における透化液処理後葉脈の暗視野顕微鏡像で，変異体では明確な主脈が認められない。なお，トランスポゾンによる植物遺伝子タギング法については，国内情報18頁を参照して下さい。

◀総説▶

DNAワクチンテクノロジーへの サイトカイン遺伝子の応用研究は 21世紀の感染症克服に貢献できる

農林水産省家畜衛生試験場

横溝 祐一

“DNAワクチン(結核菌の熱ショック蛋白遺伝子の発現用プラスミド)は結核菌感染マウスの治療に有効”と題する論文が1999年7月15日発行のNatureに掲載された¹⁷⁾。このニュースは21世紀型ワクチン開発戦略に強いインパクトを与えるテクノイノベーションとして注目を集めた。結核に限らず、次世紀のヒトの健康に暗い影を投げかけるエイズやマラリアなどに対し、また健全な畜産発展を脅かす牛のバラ結核(ヨーネ病)、サルモネラ症、白血病、クリプトスポリジウム原虫症、ネオスポラ原虫症あるいは豚の抗酸菌症など、予防・治療の決め手を欠く感染症に対しても、DNAワクチン開発への期待は大きい。

はじめに

DNAワクチンの魅力は何といっても、防御抗原蛋白の遺伝子さえクローニングできれば、精製抗原の大量生産系確立という面倒なプロセスをパスしてワクチン開発試験を開始することにある。無論、多種類の病原体のワクチン抗原遺伝子を連結した多価DNAワクチンを設計することもできる²²⁾。さらに効力からみても、液性免疫に加えて生ワクチンなみの細胞性免疫を誘導できることは大きな強みである。結核やヨーネ病などワクチン免疫が難しい病気では、その感染・発病防御に細胞性免疫が決定的な役割をはたしている。つまり、これらの病原体の駆逐には、活性化したリンパ球やマクロファージが病原体攻撃の主役となり、抗体の役割は少ない。このような細胞性免疫の誘導にはIL-2、IL-12、IL-18やIFN γ などのサイトカインの支援が必須である。サイトカインの遺伝子をDNAワクチンの設計に巧み組み込めば、防御免疫効果を格段に高めることができる。実際にIL-12のような細胞性免疫を選択的に増強するサイトカインをDNAワクチンに利用すると、BCGのような生ワクチン(結核防御に役立たない抗体も増産させてしまう)の性能を凌ぐこともでき

YOKOMIZO Yuichi

〒305-0856 つくば市観音台3-1-1

る。

本稿の前半ではDNAワクチンの特性を、ついで家畜感染症にポイントをおいてDNAワクチンの開発研究の現状を紹介し、後半ではDNAワクチンの性能アップにはたすサイトカインのgenetic adjuvant(遺伝子アジュバント)に焦点をあてて解説する。

1) DNAワクチンによる免疫誘導機構

DNAワクチンの成分特徴は、従来のワクチンの主成分となっている抗原蛋白を含まないことにある。DNAワクチンの基本骨格は動物細胞内での遺伝子転写に必要なプロモーター/エンハンサーを含む発現用プラスミドに病原体の抗原遺伝子を組換えたものであり、プラスミドという媒体を用いる一種のベクターワクチンである。DNAワクチンの投与には一般に遺伝子銃(図1)を用いて皮内、皮下に噴射するが、経鼻/経口投与すれば呼吸器、消化器、生殖器などの局所免疫と全身免疫とを同時に強化することもできる^{6, 18)}。プラスミドを動物細胞内に効率よく送り込むために組換えプラスミドを詰めた細胞内寄生菌(リステリアやサルモネラ)弱毒株を利用することもできる⁵⁾。ワクチンプラスミドは主に樹状細胞という抗原提示細胞に取り込まれる。プラスミドは細胞の核内においてmRNAに転写

され、ついで細胞質内でペプチドに翻訳されて抗原蛋白が生産される(図2)。このように、DNAワクチンを用いれば弱毒生ワクチンと同じように抗原提示細胞内で新たにワクチン抗原蛋白が作られることになる。細胞内で新たに作られた抗原は生ワクチンと同様にMHCクラスIを介しての細胞性免疫を誘導しやすい利点をもつ(図2)。またプラスミド中のペニシリン耐性遺伝子に含まれる非メチル化CpGモチーフがマクロファージやNK細胞にIL-6、IL-12、IFN γ などのサイトカイン産生や、補助刺激分子(CD40,B7)の発現を促す性質をもつため¹⁶⁾、細胞性免疫を誘導する1型ヘルパーT細胞の応答を増強する。無論、DNAワクチンは筋肉細胞、粘膜上皮細胞などにも取り込まれ、それから発現された抗原はマクロファージなどの抗原提示細胞に取り込まれて、MHCクラスIIを介して提示されるので、抗体産生も誘導することができる。DNAワクチンプラスミドは動物細胞の中での増殖性はなく、宿主ゲノムに組み込まれにくいという利点もある。防御抗原の遺伝子さえクローニングできれば、大量調製は容易であり、また組換え防御抗原蛋白の調製が難しい病原体にもワクチン対応が可能であることから夢のワクチンとさえも喧伝される。冒頭に紹介した

結核免疫の例では、DNAワクチンがCD8⁺/CD44hi(メモリー細胞マーカー)/IFN γ 産生性の細胞傷害性T細胞(細胞性免疫の主要エフェクター細胞)を選択的に誘導できることが最大の利点となる。ひきかえ現行のBCG生ワクチンでは、細胞性免疫を抑制する作用をもつIL-4産生性のTH2系も活性化されるので、DNAワクチンの方が結核免疫強化には有利ということになる¹⁷⁾。

2) DNAワクチンの獣医学領域での開発現況

エイズウイルス(HIV)、インフルエンザウイルス、B型肝炎、マラリア原虫などのヒトの感染症を対象とするDNAワクチンについては、マウスでの基礎試験を終えて、臨床試験段階にすすんでいるものもある。他方、獣医学領域でも、家畜・家禽・養殖魚の感染症を対象にDNAワクチンの開発研究が活発に行われている。例えば牛RSウイルスDNAワクチンで牛を皮内免疫すると血清抗体及びウイルス攻撃後のIgA抗体価の強い上昇がみられ、鼻汁への攻撃ウイルス排泄量も低いという²⁰⁾。またオーエスキーウイルスDNAワクチンで皮内注射した豚は筋肉注射よりも高レベルの中和抗体を誘発したという²⁵⁾。しかしDNAワクチンは市販の生ワクチンに比べて、抗体誘導能及び感染防御能がはるかに劣っているのが現状である。牛ヘルペスウイルス1(BHV-1)のDNAワクチンでの皮内注射は経鼻攻撃を防御し、また筋肉注射よりも10倍も高い抗体誘導が得られることから投与経路の重要性が伺われる²⁶⁾。このBHV-1のDNAワクチンは高レベルの移行抗体をもつ哺乳めん羊に皮内注射しても抗原特異T細胞応答が抗体陰性個体と同じように認められる。また追加DNAワクチン投与に対しては強い既往応答を示すので、記憶T細胞の誘導能をもつとみられ、この成績は幼弱動物の早期免疫賦与にも利用できる可能性を示唆している。一方、アヒル肝炎BウイルスのDNAワクチンで筋肉注射したアヒルでは攻撃ウイルスの速やかな消失と肝臓でのウイルス増殖阻止がみられ、しかも免

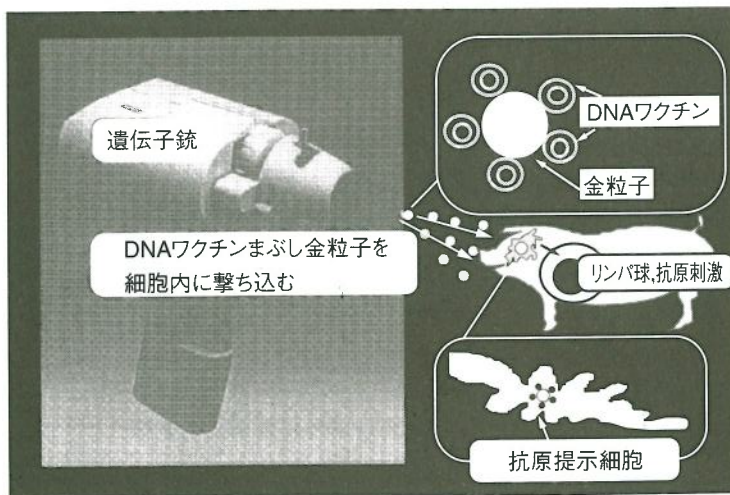


図1 DNAワクチンの免疫方法

金微粒子(直径1~数 μ m)にDNAワクチンプラスミドをまぶし、これを遺伝子銃で動物の皮内に噴射する。金粒子は樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に取り込まれ、抗原蛋白を生産し、T細胞に提示する(図2参照)。遺伝子銃を用いずに、DNAワクチンを封入した微細粒子の経鼻/経口投与では粘膜局所免疫を誘導することができる。

疫アヒル血清で受動免疫した初生ヒナは攻撃ウイルス増殖を完全に阻止することから中和抗体の産生が確認できる²³⁾。興味深いことに、クラミジア (*Chlamydia psittaci*) の外膜蛋白 DNA ワクチンを遺伝子銃で経皮免疫した七面鳥の血中抗体価は低レベルであったが、感染防御効果がみられたという²⁷⁾。最近、クリプトスポリジウム原虫 (*Cryptosporidium parvum*) の DNA ワクチンで経鼻免疫したためん羊では血中と初乳中に高レベルの抗体が産生され、それを与えた子羊では原虫の腸管感染防御が認められている¹⁹⁾。また牛ヘルペスウイルス-1 発現 DNA ワクチンを遺伝子銃免疫した牛では液性免疫に加えて細胞性免疫も誘導され、長期防御免疫も誘導された²⁾。

このように DNA ワクチンは細胞性免疫に加えて液性免疫も誘導できるが、従来型ワクチンよりは効力がやや劣るのが現状である。これは DNA ワクチンが生ワクチンやアジュバント加不活化ワクチンに比べて、免疫系に対するサイトカイン産生誘発能が弱いこと、そして APC の補助刺激分子の発現誘導能が劣ることが一因である。そこで、以下に述べるように、抗原提示細胞やヘルパー T 細胞を活性化するようなサイトカイン遺伝子や補助刺激分子を DNA ワクチンと同じ様に遺伝子発現用プラスミドに組換え、genetic adjuvant として利用する研究が活発に行われている。

2) サイトカインの genetic adjuvant としての利用

アジュバント効果の期待できるサイトカインとしては、IL-2, IL-1 β (IL-2 γ 誘発による T 細胞活性化作用をもつ), GM-CSF (APC である樹状細胞の分化促進, 抗原提示能増強を促す), IFN γ (MHC クラス II 分子の発現を増強), そして IL-4, IL-5, IL-6 (B 細胞の分化・成熟を刺激する) や IL-12 (ヘルパー T 細胞や CTL の増殖・分化に関係) などがある。サイトカインを genetic adjuvant として利用する場合はサイトカイン遺伝子と抗原遺伝子とを別個のプラスミドに発現させるか、同一プラ

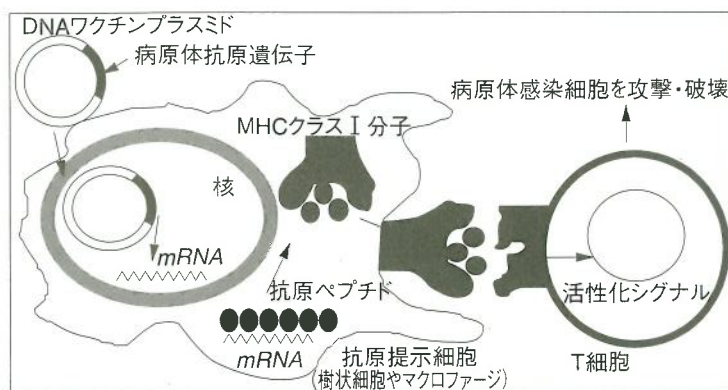


図2 DNA ワクチンの構造

本体は動物細胞で機能する転写プロモーター (一般にサイトメガロウイルス初期蛋白プロモーター使用) と病原体防御抗原遺伝子を含むプラスミドである。細胞内 (主に抗原提示細胞の樹状細胞) で転写・翻訳を経て発現した抗原蛋白は MHC クラス I 分子と合体し提示され、CD8T 細胞の抗原受容体 (TCR) に提示されるので、細胞傷害性 T 細胞を中核とする細胞性免疫を誘導できる。無論、生産された抗原蛋白は再度抗原提示細胞にとりこまれクラス II 分子とともに提示されるので B 細胞を刺激し、液性免疫 (抗体) も誘導することができる。

スミド中に連結して発現させる。サイトカイン遺伝子の種類を選ぶことで、細胞性免疫または液性免疫をかなり選択的に増強することも可能であり (図3), 次にいくつかの実験例を紹介する。HIV の DNA ワクチンと GM-CSF 発現プラスミドとの同時投与では単独投与よりも顕著に高い抗体応答誘導が、また IL-12 発現プラスミドとの同時投与では CTL 応答の増強がみられる^{1,11)}。サルの後天性免疫不全ウイルスや B 型肝炎ウイルスの DNA ワクチン筋肉注射例では IL-4, IL-10 または GM-CSF 発現プラスミドの同時注射により血中に IgG1 抗体 (Th2 型) を顕著に高める効果が得られ、ひきかえ IL-12 発現プラスミドは IgG2 抗体 (Th1 型) 上昇と CTL 反応を増強する効果を示す^{3,12)}。ところでヒト単純ヘルペスウイルス DNA ワクチンと Th1 型サイトカイン (IL-2, IL-12, IL-15 または IL-18) との同時注射は、強毒ウイルス感染に対する死亡率、肝炎の程度の軽減をもたらすが、Th2 型サイトカイン (IL-4, IL-10) 発現プラスミドの同時注射では攻撃マウスの死亡率と発病率はかえって高くなるという。この結果は genetic adjuvant に用いるサイトカインの種類によって誘導する免疫の特性を制御できることを意味している¹⁴⁾。マラリアの DNA ワクチンでは GM-CSF 発現プ

4 総説

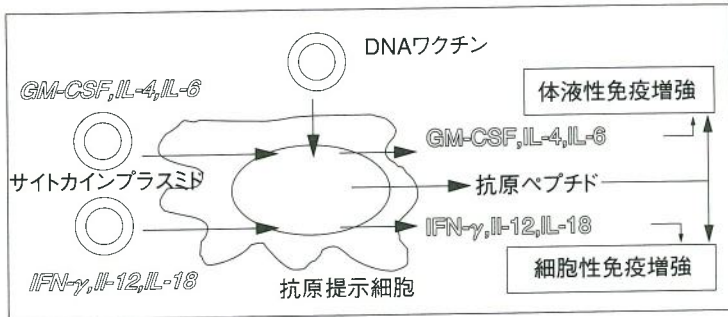


図3 サイトカインの genetic adjuvant としての利用性

サイトカイン遺伝子をDNAワクチンと同じ原理で動物細胞で発現させれば、遺伝子アジュバント (genetic adjuvant) としてDNAワクチンの効力増強に利用できる。IFN γ 、IL-12、IL-18発現プラスミドは細胞性免疫誘導に、GM-CSF、IL-4、IL-6発現プラスミドは体液性免疫増強に働く。ただし、GM-CSF発現プラスミドは細胞性免疫 (細胞傷害性T細胞) の増強にも有効である。サイトカイン以外にも、B7-2やICAM-1、LFA-1の様なT細胞活性化のための補助刺激分子の遺伝子発現プラスミドも有力な genetic adjuvant となる。

ラスミド投与により感染防御効果、抗体産生、細胞性免疫を顕著に増強することが報告されている。すなわちDNAワクチン単独免疫での防御率が25%であるのに比べて、GM-CSF発現プラスミドを併用すると58%にまで上昇する²⁸⁾。

サイトカイン遺伝子は防御抗原遺伝子と連結状態で発現させてもアジュバント効果がみられる。例えばHIV-1のエンベロープ遺伝子の下流にGM-CSF遺伝子を連結し同時発現させることによっても高レベルのIgG抗体上昇がみられ、一方、T細胞増殖反応はIL-2遺伝子とのキメラプラスミドにより著しく増強されるという¹⁵⁾。サイトカイン以外にも免疫細胞の補助刺激分子の遺伝子発現プラスミドの利用性が検討されている。インフルエンザ核蛋白DNAワクチンのCTL誘導はB7-2 (CD86: APCの補助刺激分子) 発現プラスミドの同時注射によっても増強される¹¹⁾。このようなアジュバント効果は、B7-2リガンドがT細胞のCD28レセプターに結合し、抗原刺激を受けたT細胞の増殖が一層促進されることによるものである¹¹⁾。またHIVのDNAワクチンでは、ICAM-1、LFA-1 (抗原提示細胞上のICAM-1とT細胞上のLFA-1が結合してからT細胞レセプターへの抗原刺激が伝達される) などの補助刺激分子の発現プラスミドとともに注射するとヘルパーT細胞増殖反応、CTL応答の増強が認められる (図3)。ヘルパーT細胞

の補助刺激分子CD40リガンド⁶⁾やT細胞由来のRATIS¹³⁾もアジュバント効果を示すという。

粘膜投与型DNAワクチンに対してもサイトカインの genetic adjuvant としての利用性は有望である。HIV-1のDNAワクチン封入りポソームはIL-4あるいはGM-CSF発現プラスミド結合リポソームの経鼻同時投与により、血中IgG1抗体と糞便中IgA抗体の顕著な増強をもたらす。一方、IL-12+GM-CSF発現プラスミド/リポソームの経鼻同時投与は血中IgG1抗体とCTLの増強をもたらす¹⁸⁾。サイトカインプラスミドは治療への応用も検討されており⁴⁾、経鼻投与したIL-10発現プラスミドはTh1を抑制し、HSVによるアレルギー炎症病変抑制に有効であるという。

1999年末になって、ようやく動物用DNAワクチンへのサイトカイン遺伝子の応用研究成績も現れた。オーエスキー病ウイルスの糖蛋白抗原遺伝子DNAワクチンとGM-CSF発現プラスミドの同時筋肉注射を受けた豚では、攻撃強毒ウイルスの鼻汁中への排出量軽減、血清抗体上昇、体重減少に著しい改善効果が認められている²¹⁾。またGM-CSFは魚のDNAワクチンにおいても細胞性免疫の増強効果が報告されている⁹⁾。IL-12については、アナプラズマ原虫ワクチンを注射した牛での細胞性免疫応答を顕著に増強させることが報告されており²⁴⁾、今後、ヨーネ菌やサルモネラ、ヘルペスウイルス (細胞性免疫が防御に重要な役割をはたす病原体) に対するDNAワクチンを開発するうえで、サイトカインの genetic adjuvant としての応用研究は大いに役立つにちがいない。

おわりに

著者らは、現在、農林水産省の大型連携開発研究《組換えサイトカインを利用した家畜感染症の新しい防除技術の開発:1997~2003年度》に取り組んでいる。これから後期3年間をむかえるにあたり、次世代ワクチン開発へのサイトカインの応用性を強く意識した新し

い課題編成にした。特に細胞性免疫誘導に係る IL-12 及び IL-18 の課題強化を図った。さらに、2000年3月16～17日、サイトカインとDNAワクチンをキーワードとする国際ワークショップ：International Veterinary Cytokine and Vaccine Conference（企画運営委員長：寺門誠致家畜衛生試験場長。カナダの Baviuk, VIDO 所長、大阪大学の清野宏教授を初めとする日米英豪加のゲスト13名を含む150名の参加者、83演題）を、つくば国際会議場にて開催する予定である（詳細は家畜衛生試験場ホームページ：<http://ss.niah.affrc.go.jp/NIAH/work.html>、連絡先：yokomi@niah.affrc.go.jp）。家畜とヒトの健康を脅かす感染症克服に向けての熱い論議が21世紀バージョンのワクチン開発に貢献することを期待している。（2000年2月12日記）。

引用文献

- 1) Ahlers, J.D. et al., *J.Immunol.*,158,3947-3958,1997
- 2) Braun, P.P. et al., *Virology*,5,265,46-56,1999
- 3) Chow, Y. et al., *J.Immunol.*,160,1320-1329,1998
- 4) Chun, S. et al., *J.Immunol.*,163,2393-2402,1999
- 5) Dietrich, G., *Nature Biotechnology*,16,181-185,1998
- 6) Ihata, A., *Immunology*,98,436-442,1999
- 7) Iwasaki, A. et al., *J.Immunol.*158,4591-4601, 1997
- 8) Kaneko, H. et al., *Virology*,267,8-16,2000
- 9) Kanellos, T.S. et al., *Immunology*,96,507-510,1999
- 10) Kim, J.J. et al., *J.Immunol.*,158,816-826,1997
- 11) Kim, J.J. et al., *Vaccine*,16,1828-1835,1998
- 12) Kim, J.J. et al., *J.Interferon Cytokine Res.*,19, 77-84,1999
- 13) Kim, J.J. et al., *J.Clin.Invest.*103,869-877,1999
- 14) Kim, S.J. et al., *J.Virology*,73,501-509,1999
- 15) Lee, A.H. et al., *Vaccine*,17,473-479,1999
- 16) Lipford, G.B. et al., *Eur.J.Immunol.*,27,2340-2344,1997
- 17) Lowrie, D.B. et al., *Nature*,400,269-271, 1999
- 18) Okada, E. et al., *J.Immunol.*,159, 3638-3647, 1997
- 19) Sagodiras, et al., *Parasite Immunol.*,21,507-516,1999
- 20) Schrijver, R.S. et al., *Vaccine*,16,130-134,1998
- 21) Somasundaram, C. et al., *Vet. Immunol. Immunopathol.*,70,277-287,1999
- 22) Thomson, S.A. et al., *J.Immunol.*,160,1717-1723,1998
- 23) Triyantni, M. et al., *J.Virology*,72,84-94,1998
- 24) Tuo, W. et al., *Infect.Immun.*,68,270-280,2000
- 25) Van Druren Little-van den Hurk, S. et al., *J.Gen.Virology*,79,831-839,1998
- 26) Van Roji, E.M.A. et al., *Vet.Immunol. Immunopathol.*, 66,113-126,1998
- 27) Vanrompy, D.C. et al., *Vaccine*,17,2628-2635, 1999
- 28) Weiss, W.R. et al., *J.Immunol.*,161,2325-2332, 1998

◀国内情報▶

昆虫ウイルスを用いた家畜サイトカインの生産

農林水産省 家畜衛生試験場

犬丸 茂樹

蛾の核多角体病ウイルスに遺伝子を組み込み昆虫細胞に感染させ、無血清培地で培養することにより不純物の少ないウシやブタの顆粒球・マクロファージコロニー刺激因やインターフェロニン γ など様々なサイトカインを効率よく生産することができるようになった。また、カイコに接種することによりさらに効率よくウシやブタのサイトカインを生産することができた。その結果サイトカインを家畜疾病の防除に用いるための動物実験が実施できるようになった。

1. はじめに

乳牛の乳房炎等ストレスなどによる免疫系の異常によって起こる疾病や、免疫系が未発達なため損耗が激しい子牛や子豚の下痢と肺炎などは従来のワクチンでは防除が困難であり、抗生物質等による治療も難しい。そこで免疫系の制御を担う生体内因子であるサイトカインを用いた疾病の予防・治療、ワクチン増強法に大きな期待が寄せられるようになってきた。サイトカインは各種のリンパ球や食細胞などを分化、増殖させたり、炎症反応を起こさせるなど免疫機能を調節しているタンパク質で、これまでにインターロイキン (IL) 1~18, インターフェロン (IFN) - α , β , γ , τ , など約50種類が確認されており、一般に種特異性が高い。生体内で微量しか作られないサイトカインを取り出すことは困難であり、その臨床応用を図るには高純度のサイトカインを大量に安く生産する技術の確立が重要なポイントになる。そこで、無脊椎動物に特異的なバキュロウイルスのうち、ヤガという蛾の仲間に感染する *A. californica* 核多角体病ウイルス (AcNPV) を用いる遺伝子発現系とカイコに感染する核多核体病ウイルスを用いる遺伝子発現系を利用して家畜サイトカインの生産を試みた。この発現系は、発現効率が高く、哺乳類に良く似たタンパク質の修

INUMARU Shigeki
〒305-0856 つくば市観音台3-1-1

飾機構をもつことが特徴であるが、AcNPVの発現系は宿主細胞の培養に用いる無血清培地等のコストが高く、カイコを用いる発現系はカイコ体液中に発現産物が蓄積するので精製しにくい。またどちらの場合も、生体へ投与した場合の安定性等が充分明らかになっていないこと、組換え体除去法や精製法が充分確立されていないこと等の問題がある。そこで我々はこれらの問題点の解決を図り、バキュロウイルス遺伝子発現系による家畜サイトカインの生産技術の確立をめざして研究を行っている。

2. 昆虫培養細胞を宿主とする AcNPV 発現系

我々が最初に手がけたのはブタとウシの顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) である。GM-CSFは食菌・殺菌作用を担う細胞を活性化するとともに、攻撃すべき抗原を免疫系に示す抗原提示細胞の分化増殖を司る因子である。ブタのGM-CSF (poGM-CSF) 遺伝子の塩基配列は報告されていなかったため、ヒト、マウス、ウシ、ヒツジの塩基配列を参考にしてプライマーを合成し、ブタT細胞から調製したRNAを用いてRT-PCR法によってcDNAを単離した(1)。ウシGM-CSF (boGM-CSF) のcDNAについても同様な方法で単離した。これらのcDNAをゲノムに組み込んだAcNPVを蛾の一種 *T. ni* 由

来のTN5細胞に感染させ、無血清培地で培養すると、感染2日後から培養液中への組換え型 (r) poGM-CSFあるいはrboGM-CSFの分泌が認められ (図1左から1, 3番目), 感染4日目には約20 μ g/mlおよび100 μ g/mlの濃度に達した。これはバキュロウイルス発現系でもブタやウシ由来の分泌シグナルペプチドが働いて昆虫細胞から培地中に分泌されるためである。GM-CSFの分泌シグナルは、本来は分泌されるときに切断され成熟型のGM-CSFとなる。そこでバキュロウイルス発現系で分泌されたGM-CSFのシグナルペプチドが正しく切断されているかどうかを確認するため、poGM-CSF遺伝子組換えウイルス (AcPGM) 感染培養上清中に蓄積したrpoGM-CSFのN-末端アミノ酸配列を決定したところ、成熟型サイトカインのN-末端アミノ酸配列と一致したことから、分泌シグナルペプチドはバキュロウイルス感染昆虫細胞でもほ乳類細胞と同様に認識され、切断されていることが確認できた。また、天然型のGM-CSFは糖タンパク質なので、バキュロウイルス発現系で合成されたGM-CSFにもN-結合型糖鎖が付いているかどうか検討するためにN-結合型糖鎖付加の阻害剤であるツニカマイシンを培地中に添加してAcPGM感染細胞を培養した。するとrpoGM-CSFが培地中に分泌されなくなった。また、培養液中にトリチウム標識したグルコサミンを添加するとrpoGM-CSFにトリチウムが取り込まれた。これらのことからrpoGM-CSFには糖鎖が結合していることが確認できた (2)。しかし、バキュロウイルス遺伝子発現系で付加される糖鎖は哺乳類細胞で付加されるものと構造が異なっており、サイトカインの多くが糖タンパク質であるため糖鎖の有無や付加している糖鎖の構造によって安定性や反応性が影響を受ける可能性がある。幸い*in vitro*の実験では糖鎖の付いていないものでも通常活性を示すが、*in vivo*ではその影響が明らかでない。そこでこれを明らかにし、天然のサイトカインに近いサイトカインを生産するためにワイオミング大学のD. Jarvis博士らが開発した糖転移酵素遺伝子

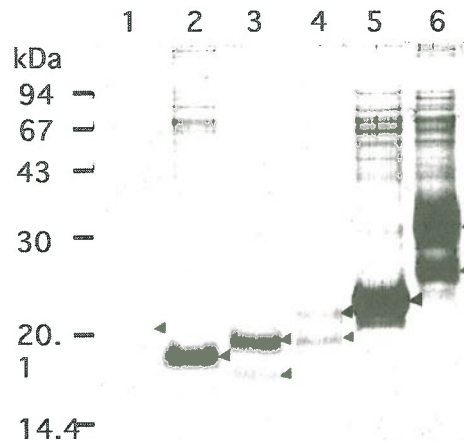


図1. 組換えウイルス感染細胞の培養液中に蓄積したサイトカイン

SDS-PAGEゲルのクマジブリリアントブルー染色像。

1: rpoGM-CSF, 2: rpoIL-2, 3: rboGM-CSF, 4: rboIFN- γ , 5: rboIFN- τ , 6: rboM-CSF β 組換えウイルス感染細胞培養上清 ▲で組換え型サイトカインのバンドを示す。結合している糖鎖の違いによって複数のバンドになるものがある。

を導入した細胞を用いて (3) 組換え型糖タンパク質の糖鎖構造を哺乳類のものに近づけるための検討を行っている。

このようにして生産した組換え型GM-CSFに生物活性が有るかどうか検討するため、rpoGM-CSFとrboGM-CSFをブタおよびウシの骨髄細胞培養系に添加した。すると、これらの骨髄細胞の増殖反応が認められた。rpoGM-CSFでは、ブタ骨髄細胞から造血細胞のコロニー形成を誘導し、まれに、活発に増殖する骨髄細胞に混じって巨核球様の細胞の分化が観察された。また末梢血単核球の培養細胞系においては樹状細胞様の細胞のクラスター形成を誘導し、樹状細胞の一種であるベール細胞様の大型の細胞 (図2) の分化が認められた。これはrpoGM-CSFが天然のpoGM-CSFと同様な生物活性を発揮し、骨髄細胞や末梢血単核球の増殖・分化を促したためである。樹状細胞は抗原提示細胞として重要な細胞であるため、rpoGM-CSFが抗原特異的免疫増強に有効であることが期待される。

我々はさらに、免疫系を活性化する代表的因子であるブタIL-2とウシIFN- γ 、黄体退行を阻止して妊娠を維持するとともに抗ウイル

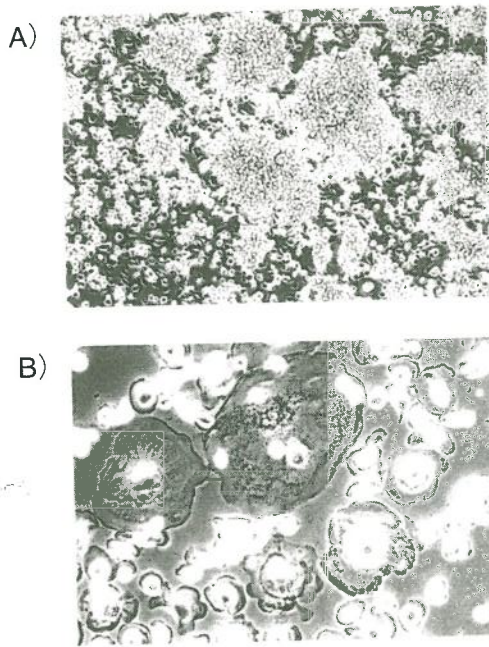


図2. rpoGM-CSF 添加培地で培養したブタ末梢血単核球
A) 樹状細胞様の細胞で構成されたクラスター
B) ペール細胞様の大型の細胞

ス作用も持つウシIFN- τ 、マクロファージを増殖させるウシM-CSF β などをこのAcNPV発現系を用いて生産した(図1左から2, 4, 5, 6番目)。これらは50 μ g/mlから200 μ g/mlの濃度で培養液中に蓄積し、いずれも生物活性が認められた。本発現系によって生産されたサイトカインは無血清培地中に蓄積するため不純物が少なく精製も容易で、たとえばウシIFN- γ はイオン交換カラム精製だけで純度約95%にまで精製されるなど、これまでに試みたものでは1~2段階の処理で90%以上の純度が得られている。

AcNPV遺伝子発現系でサイトカインを大量生産するためには、細胞の大量培養が必要であり、タンパク質生産に適した細胞と培養条件、培養システムが必要である。そこで我々は発現効率の高いTN5細胞を無血清培地で浮遊培養できるように馴化した。この細胞は高速回転培養法で良く増殖し、静置培養と同様の発現効率を示した。現在、民間の企業と共同でサイトカインの大量生産に適した培養装置の開発に着手したところである。

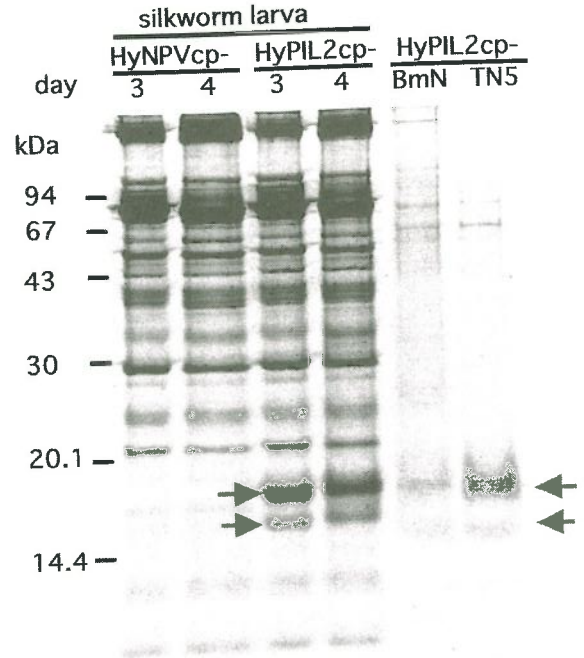


図3. poIL-2 遺伝子組換え HyNPV2 接種カイコ体液中に蓄積した rpoIL-2

SDS-PAGEゲルのクマジブリリアントブルー染色像

HyNPVcp-: 接種後3, 4日目の非組換えウイルス接種カイコ体液各2 μ l

HyPIL2cp-: 接種後3, 4日目の組換えウイルス接種カイコ体液各2 μ l

BmN, TN5: poIL-2 遺伝子組換え HyNPV を感染させた培養細胞 BmN (カイコ由来) および TN5 (T.ni 由来) 上清 20 μ l

矢印で rpoIL-2 の泳動位置を示す。

3. カイコを宿主とする HyNPV 発現系

カイコ多角体病ウイルス (BmNPV) に遺伝子を組み込みカイコに感染させると非常に効率よく分泌タンパク質を体液中に蓄積することが報告されているが(4), AcNPV 遺伝子発現系との比較は行われておらず、特に発現効率の高い TN5 細胞を用いた場合とどの程度の差があるのか分からなかった。京都工芸繊維大学の森肇博士が開発したハイブリッドウイルス HyNPV (5) はどちらの系にも感染し、組換え型タンパク質を生産できるので、このウイルスを用いてサイトカインの発現効率を比較した。プタ IL-2 遺伝子を組み込んだ HyNPV を構築し、カイコに接種したところ rpoIL-2 が

体液中に蓄積した(図3)。その濃度は最高約3 mg/mlでTN 5細胞の培養上清中の濃度の約7~20倍だった。また、このrpoIL-2は高い生物活性を示すことも確認された。今後は条件検討を重ねてサイトカイン生産に適した接種、飼育条件、発現したrpoIL-2の性状、精製法を検討するとともに他のサイトカインの発現も検討する予定である。

4. おわりに

ここで紹介した様に、生物活性を有するサイトカインを大量に生産できるようになったため、我が国での家畜サイトカインに関する研究が活発化し、ウシ、ブタへのサイトカインの投与実験が数グループによって開始されており、サイトカイン製剤開発に有望なデータも出つつある。今後、昆虫工場での生産、組換え産物の機能解析や構造改変なども念頭に置いて精製法や培養法を検討するとともに量

的、質的に優れたサイトカインの生産を目指したい。また、サイトカインを家畜疾病の防除に役立てようとする研究は国際的にも活発になってきており、研究者間で成果を共有しあい、コミュニケーションを高めるためには家畜のサイトカインでも共通の生物活性単位を使用することが必要だとおもわれる。そこで、バキュロウイルス発現系での大量生産技術を生かし、規準となる各サイトカインの標準品を作成したいと考えている。

文献

- (1) Inumaru, S. Takamatsu H. (1995) Immunol. Cell Biol. 73 : 474-476.
- (2) Inumaru, S. et al. (1998) Immunol. Cell Biol. 76 : 195-201.
- (3) Hollister, J.R., Shaper, J.H. and Jarvis, D.L. (1998) Glycobiol. 8 : 473-480.
- (4) Maeda, S. et al. (1985) Nature 315 : 592-594.
- (5) Mori, H. et al. (1992) J. Gen. Virol. 73 : 1977-1880

◀国内情報▶

サイトカインの動物臨床への応用

東京農工大学農学部附属家畜病院

板倉 敦子・松田 浩珍

サイトカインは、免疫・炎症反応のみならず、造血系、内分泌系および神経系の制御因子としても機能していることから、サイトカイン投与による生体内反応の調節が試みられるようになった。ヒトの疾病治療を目的としたサイトカインの臨床応用はすでに開始され、成果をあげている。獣医領域においても感染症や腫瘍の治療・予防に対するサイトカイン投与の有効例が報告されており、今後の家畜医療に対するサイトカインの応用が期待される。

1. はじめに

インターロイキン (IL) やインターフェロン (IFN) をはじめとするサイトカインは、複雑なネットワークを形成することによって免疫・炎症反応や造血反応の制御に深く関わっている。それらのサイトカイン遺伝子の単離および組み換え DNA 技術の発達によって大量に組み換えサイトカインが得られるようになると、サイトカインを利用した生体防御応答の制御法開発が盛んに行われるようになってきた。すでにヒトおよび家畜の疾病治療を目的としたサイトカイン製剤の臨床応用が開始されており、サイトカインの薬剤としての有用性が明らかにされつつある。しかしながら、動物種に固有なサイトカインの入手が困難であるために、サイトカインに対する中和抗体の産生や、動物種の違いによる有効性の差異など、異なる動物種のサイトカインを用いるが故に引き起こされる副作用が問題となっている。

本稿では、家畜に対して臨床応用が試みられているサイトカインを紹介し、その有効性および問題点について解説するとともに、今後の動物医療におけるサイトカインの治療および予防薬としての可能性について論じてみたい。

ITAKURA Atuko, MATSUDA Hiroshi

〒183-8509 府中市幸町 3-5-8

2. IFN

IFN は、抗ウイルス作用を有することからその名がつけられたが、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、T細胞など、広範な免疫担当細胞に作用し、それらの機能を調節することによって免疫反応を制御している^{1,2)}。IFN には α 、 β 、 γ などのサブタイプが存在し、ヒトでは主に IFN- α がウイルス感染症や腫瘍、免疫介在性疾患の治療に用いられている¹⁾。獣医領域ではウイルス、細菌および原虫などの感染症に対する治療および予防薬としての IFN の有用性が検討されている。

小動物に感染症をひき起こすウイルスの中では、ネコ伝染性腹膜炎ウイルスおよびネコ白血病ウイルスに対して human (Hu) IFN- α が *in vitro* で抗ウイルス作用を発揮することが報告されている^{3,4)}。しかし、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス感染症に対する HuIFN- α 投与の効果は感染させるウイルス力価によって異なり、高力価のウイルス感染に対しては生存率に全く影響を与えなかった⁵⁾。また、bovine (Bo) IFN- β と抗生物質との併用により、非再生性貧血を伴うネコ白血病ウイルス感染症の症状に改善が認められたが、無効な症例も報告されている⁶⁾。イヌパルボウイルス性腸炎に対する felineIFN- ω の効果も調べられているが、著明な臨床症状の回復は認められなかった⁷⁾。よって、ウイルス感染症の治療を目的として IFN の単独投与を行うことは非現実

的であるが、補助的な治療薬としての使用は有意義であると考えられる。大動物では主に呼吸器および消化器障害を引き起こすウイルス感染症に対するIFNの臨床的有用性が検討されている。ウシ呼吸器症候群は種々の病原微生物の混合感染によって発症誘導されるが、その原因となるウシ伝染性鼻気管炎ウイルスおよびワクシニアウイルスの実験感染による症状および死亡率はHuIFN- α を経鼻的あるいは筋肉内に投与することによって軽減したが、HuIFN- α は3型パラインフルエンザウイルス感染に対しては効果を発揮しなかった⁸⁾。さらに、HuIFN- α は下痢を主徴とするブタ伝染性胃腸炎、幼牛および幼豚のロタウイルス感染症の発症率や死亡率を低下させることが報告されており、HuIFN- α の予防薬としての有効性が示唆された^{8,9)}。しかし、IFNの投与時期や幼獣の日齢によってIFNの効果が異なり⁹⁾、非経口的に全身投与を行った場合には抗HuIFN- α 抗体の産生および発熱や不安、肝酵素値の上昇などの副作用が発現するケースもあるため⁸⁾、さらなる検討が必要とされる。また、ウシの原虫感染に対するIFNの有効性も検討されており、HuIFN- α の経口投与は*Babesia bigemina*および*Anaplasma marginale*感染に対しては無効だが、*Theileria parva*感染の発症を抑制することが報告されている⁸⁾。

他方、乳牛をターゲットとしてIFNを利用した乳房炎対策法の開発が試みられている。前もって、乳房内へBoIFN- γ を注入しておく、*Escherichia coli*感染による死亡率および感染乳房数が低下したことから、IFN- γ の乳房炎予防薬としての可能性が示された⁸⁾。また、乳房内に試験抗原とBoIFN- γ を注入すると、抗原を単独で注入した場合よりも血中の抗原特異的抗体価が顕著に上昇することが報告されており²¹⁾、IFN- γ は乳房炎の予防対策としてワクチネーションを行う際のアジュバントとしても有効であることが示唆された。しかしながら、高用量のIFN- γ の乳房内注入は乳汁pHおよび体細胞数を上昇させるため⁸⁾、投与量に関しては詳細な検討が必要であ

る。

3. 造血因子

1) 顆粒球コロニー刺激因子

造血因子とは、骨髄の未分化な造血系細胞の分化・成熟を誘導するサイトカインの総称であり、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子、IL-3およびエリスロポエチン (EPO) などがある。

G-CSFはマクロファージや骨髄のストローマ細胞から産生され、骨髄における好中球の増殖・分化を誘導するとともに、骨髄から末梢循環への成熟好中球の放出を促進することによって末梢血中の好中球数の増加に寄与している¹¹⁾。さらに、G-CSFは成熟好中球の機能を高める効果も併せ持っているため、好中球の減少および機能低下が引き起こされるような病態に対してG-CSFの投与が試みられている。各家畜に特異的なG-CSFが市販されていないため、獣医領域では主にHuG-CSFが用いられており、悪性腫瘍に対する化学療法あるいは放射線療法を受けたイヌおよびネコで誘発された好中球減少やグレーコリーの周期性造血に対する有効性が示されている^{12, 13)}。また、イヌパルボウイルス感染によって誘発された好中球減少症に対し、HuG-CSF投与の有効例が報告されているが、動物種および好中球減少の程度によっては効果を発揮しない場合もあり¹⁴⁾、治療薬としての確立にはさらなる検討が必要だろう。小動物のみならず、ウマおよびウシにおいてもBoG-CSF投与による血中好中球数の増加が確認されており^{15, 16)}、今後の大動物医療におけるG-CSFの疾病治療薬としての可能性が期待される。

2) EPO

EPOは赤血球の増殖・分化に必須の因子であり、臨床応用の目的にはHuEPOが用いられることが多い。HuEPOは各種貧血の治療に使用されているが、とくにEPOの産生臓器である腎臓の疾患に起因するEPO産生低下が原因となって引き起こされる低形成性貧血の治療

に成果をあげている。腎障害を呈するイヌおよびネコにHuEPO投与を行うと、赤血球数、ヘモグロビン値およびヘマトクリット値が上昇するとともに、食欲増大、体重増加、運動性の亢進などの臨床症状の改善も認められる。しかし、長期間の連続投与を行うと抗HuEPO抗体の産生が誘導され、HuEPOのみならず内在性のEPOの作用をも阻害してしまうため、貧血の悪化を引き起こす症例も報告されている¹⁷⁾。同様の現象はウマへのHuEPO投与によっても誘導され、ウマにおいてはHuEPO投与の貧血治療に対する有効性は確認できていない¹⁸⁾。

4. IL-1 β , IL-2

IL-1 β およびIL-2はそれぞれ主としてマクロファージおよびT細胞から産生され、単球・マクロファージの活性化、T細胞の増殖・分化、ナチュラルキラー細胞の活性化促進作用

などを有し、免疫反応の制御において重要な役割を果たしている^{19,20)}。また、IL-1 β はIL-2よりも広範な細胞に対して作用を及ぼし、急性炎症反応をひき起こす起炎性サイトカインとしても機能している。そこで、これらの多岐にわたる免疫反応増強効果を利用し、IL-1 β およびIL-2はワクチンに対するアジュバントとして用いられている。IL-1 β は *Streptococcus suis* ワクチンと、IL-2は仮性狂犬病ウイルスワクチンあるいはI型ウシヘルペスウイルスワクチンと同時に投与することにより、ブタあるいはウシへのワクチネーションの効果を高めることが観察されているが、高用量のIL-1 β は嘔吐や嗜眠、増体重量の減少をひき起こすため、投与量の決定には十分な検討が必要である²¹⁻²³⁾。IL-2については乳房炎の治療薬としての有効性も調べられており、*Staphylococcus aureus* を実験感染させた乳房へのIL-2の投与は、乳汁中のマクロファージおよび好中球数を増加させ、細菌除去に促進的

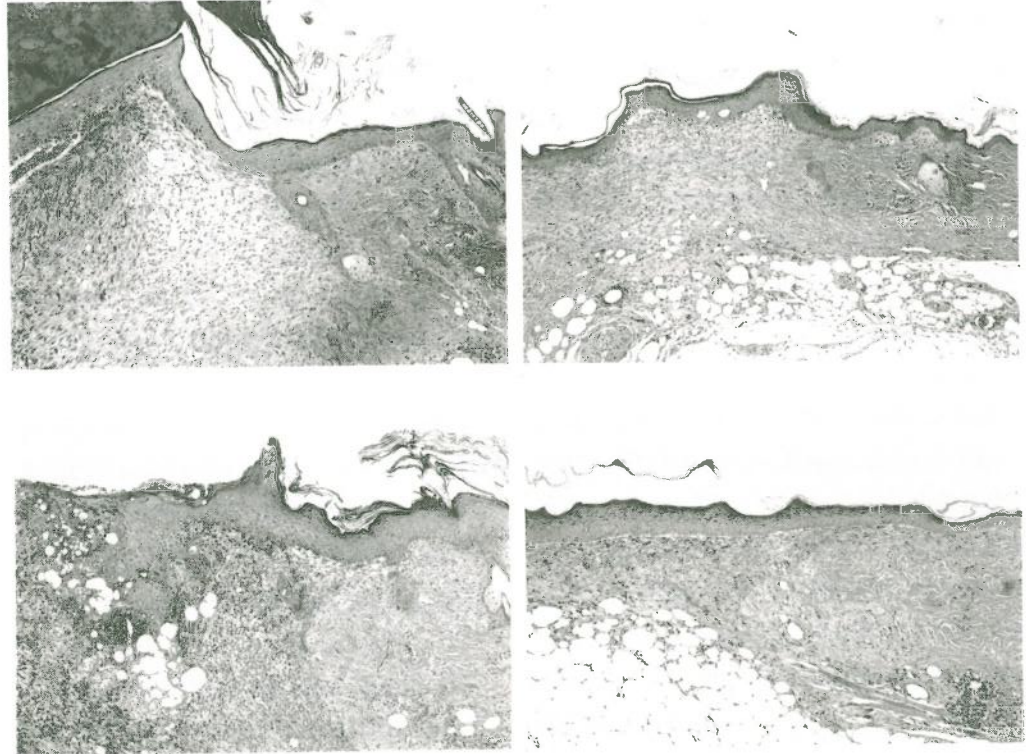


写真1 NGFによる皮膚創傷治癒促進効果

C57BL/6 (上段) および糖尿病KK/Ta (下段) マウスの創傷部位に三日間1 μ gのNGF (右側) あるいは希釈液のみ (左側) を投与し、創傷作成後8日目に採取した創傷部位のHE組織標本。C57BL/6マウスだけでなく、治癒障害を呈する糖尿病KK/Taマウスにおいても、NGFは創傷治癒を促進および正常化させている。

に働くことが報告されている²⁴⁾。また、IL-2は局所投与することによって上皮性腫瘍に対する抗腫瘍効果を発揮することが確認されている²⁵⁻²⁷⁾、単独投与により腫瘍を完治させることは困難であり、外科的療法や他の化学的療法との併用が最も有効な使用方法であろう。

5. 神経成長因子

神経成長因子 (NGF) は、末梢の知覚・交感神経および一部の中樞神経細胞の生存維持および機能発現に必須の因子である²⁸⁾、マスト細胞、好中球、マクロファージなどの免疫担当細胞に対しても生存維持や機能亢進作用を發揮することを我々は明らかにしてきた³⁰⁻³³⁾。最近、我々は、NGFが創傷治癒促進効果を持ち、その効果は創傷治癒の遅延が見られる糖尿病マウスに対しても有効であることを見出した (写真1)³⁴⁾。糖尿病患者では皮膚および血中のNGF濃度が低いことから^{35, 36)}、糖尿病患者で見られる創傷治癒の遅延および神経障害はNGF濃度の低下が一因となっている可能性がある。よって、NGFが創傷および糖尿病患者・患畜で見られる末梢神経障害に対する画期的な治療薬になることが強く示唆され、臨床応用の実現が期待される。

参考文献

- 1) Farrar MA and Schreiber RD (1993) *Ann Rev Immunol* 11:571-611
- 2) Stanton GJ, et al (1987) *Invest Radiol* 22:259-271
- 3) Weiss RC and Toivio-Kinnucan M (1988) *Am J Vet Res* 49:1329-1335
- 4) Jameson P and Essex M (1983) *Antiviral Res* 3:115-120
- 5) Weiss RC, et al (1990) *Am J Vet Res* 51:726-733
- 6) Weiss RC (1988) *J Am Vet Med Assoc* 192: 681-684
- 7) Ishiwata K, et al (1998) *J Vet Med Sci* 60: 911-917
- 8) Moore BR (1996) *J Am Vet Med Assoc* 208: 1711-1715
- 9) Cummins JM, et al (1995) *Vet Immunol Immunopathol* 45:355-350
- 10) Pighetti GM and Sordillo LM (1996) *Am J Vet Res* 57:819-24
- 11) Leischke GJ and Burgess AW (1992) *N Engl J Med* 327:28-35
- 12) Henry CJ, et al (1998) *Compend Contin Educ Pract Vet* 20:728-735
- 13) MacVittie TJ, et al (1990) *Int J Radiat Biol* 57: 723-736
- 14) Rewerts JM and Henry CJ (1998) *Compend Contin Educ Pract Vet* 20:823-828
- 15) Madigan JE, et al (1994) *Equine Vet* 26:159-161
- 16) Kehrl ME Jr, et al (1991) *J Dairy Sci* 74:2448-58
- 17) Cowgill LD, et al (1998) *J Am Vet Med Assoc* 212:521-528
- 18) Piercy RJ, et al (1998) *J Am Vet Med Assoc* 212:244-247
- 19) Dinarello CA (1991) *Blood* 77:1627-1652
- 20) Smith KA (1992) *Curr Opin Immunol* 4:271-276
- 21) Blecha F, et al (1995) *Vet Immunol Immunopathol* 44:329-346
- 22) Kawashima K and Platt KB (1989) *Vet Immunol Immunopathol* 22:345-353
- 23) Hughes HP, et al (1991) *Immunology* 74:461-466
- 24) Quiroga GH, et al (1993) *Am J Vet Res* 54: 1894-1900
- 25) Otter WD, et al (1999) *Cancer Immunol Immunother* 48:419-420
- 26) Hill FW, et al (1994) *Vet Immunol Immunopathol* 41:19-29
- 27) Otter WD, et al (1993) *Anticancer Res* 13: 2453-2455
- 28) Levi-Montalcini R, et al (1963) *Dev Biol* 7:653-659
- 29) Korsching S, et al (1985) *Trends Neurosci* 9: 570-577
- 30) Kannan Y, et al (1991) *Blood* 77:1320-1325
- 31) Susaki Y, et al (1996) *Blood* 88:4630-4637
- 32) Kannan Y, et al (1992) *Biochem Biophys Res Commun* 186:1050-1056
- 33) Kawamoto K, et al (1995) *Blood* 86:4638-4644
- 34) Matsuda H, et al (1998) *J Exp Med* 187:297-306
- 35) Faradji V, et al (1990) *Acta Neurol Scand* 81: 402-406
- 36) Anand D, et al (1996) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351:449-454

◀国内情報▶

抗アレルギー評価のための ヒト免疫担当細胞株の樹立

農林水産省野菜・茶業試験場, *北九州工業高等専門学校
山本(前田)万里, 川原浩治*

食品中の抗アレルギー物質検定系に用いるためのヒト免疫担当細胞株を細胞融合法により樹立した。各細胞株を得るために最適な融合親細胞株の樹立, IgE産生B細胞を効率的に取得するための対外刺激法, 効率的にT細胞株を取得するための細胞融合法について有効な方法を開発した。

1. はじめに

近年, 過度の免疫反応であるアレルギーが社会問題化し, その解決が急務となってきた。抗アレルギー剤を利用するものが小児に多く副作用が心配であること, 治療が多年に渡るため医療費の増大が懸念されることなどから, 日常摂取している食品によりアレルギー治療, 予防を期待する声が高まってきた。そこで, 食品中の抗アレルギー物質を検索することが重要な研究となるのだが, 食品成分の抗アレルギー作用の検定・評価系では, 種々の免疫担当細胞株が必要となる。特に, 生体内と同様の免疫機能を有したヒト由来の各種免疫担当細胞株が利用できれば, 抗アレルギー機能のみならず, 多くの免疫機能評価が可能となる。しかしながら, これらの検定系に有用なヒト細胞株は少なく, 入手が困難であった。そこで, 種々のヒト免疫担当融合細胞株を取得することを試みた。また, 抗アレルギー性評価検定系で必要となるアレルゲン特異的なヒト型IgE抗体を得るため, ヒト末梢血リンパ球を用いて, 効率的なヒトIgE抗体の産生誘導を行い, モノクローナル抗体産生株として取得を試みたのでその実施例を概説する。

MAEDA-YAMAMOTO Mari

〒428-8501 静岡県榛原郡金谷町金谷2769

* KAWAHARA Hiroharu

〒802-0985 北九州市小倉南区志井5-20-1

2. 動物細胞の不活化について

ヒト, マウスなど動物の細胞は, 対外に取り出して培養(初代培養)していると, しばらくして急速に分化機能を失い死滅してしまう。評価系などで恒常的に同じ形質の細胞を使用したい場合には, それでは非常に扱いにくい。そこで, 細胞を不活化するというところを行う必要がでてくる。不活化(Immortalization)とは, 遺伝的に異常になった細胞の一部が無限増殖能を獲得して増殖するように細胞を改変することである。このような細胞を樹立細胞株と呼ぶ。樹立細胞株の多くは生体内で発現していた多くの分化機能を失い, がん細胞に似たような性質をもっているが, 中には特定の分化機能を維持している細胞が得られることがあり, こうした細胞株の中から必要とする形質の細胞株を選択していく。

ヒト免疫担当細胞株(不活化細胞)を得るための細胞工学的手法としては, 細胞融合法, エチルメタンスルホネートやニトロニトロソグアニジンなどの発がん剤処理, がん遺伝子や癌ウイルス導入するトランスフォーメーション法などが考えられる。われわれは, ヒト免疫担当細胞株を効率よく取得するための方法として, 細胞融合法(図1)を応用した。これは, 無限増殖能を持ち, 高アミノプテリン感受性(融合後, 融合細胞株と選択するためのマーカー)である融合親細胞株と生体内のリンパ球などの細胞とをポリエチレングリ

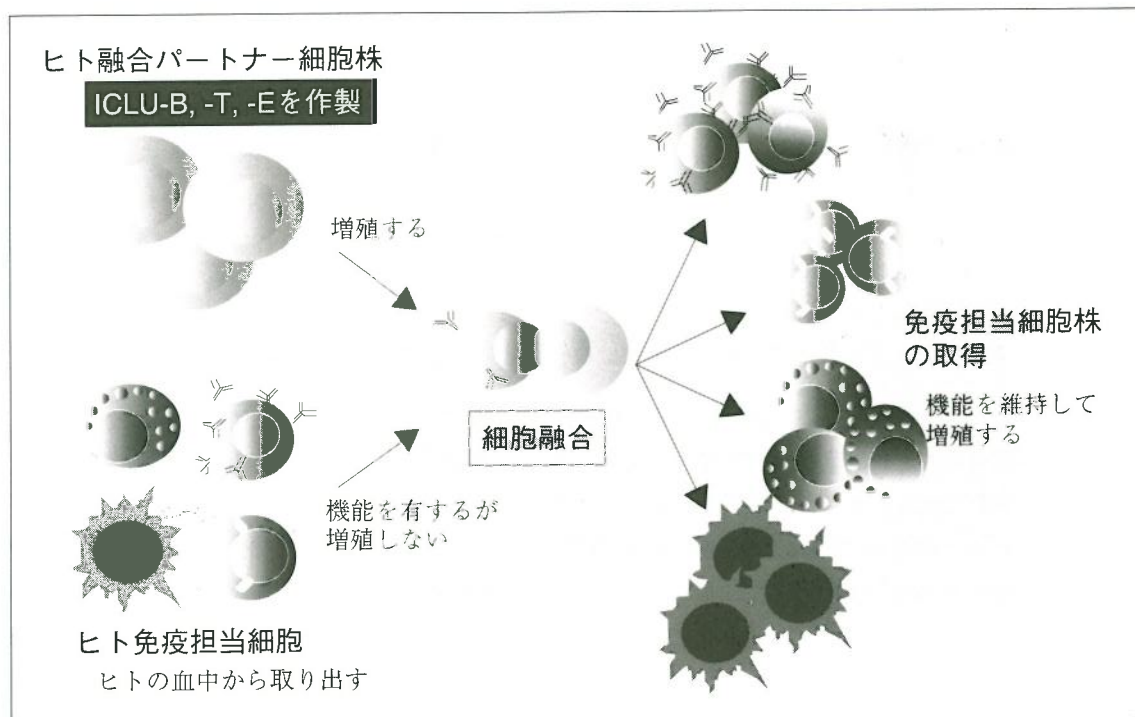


図1 細胞融合を用いたヒト免疫担当細胞株の作製

ヒト免疫担当細胞は体外に取り出すと死んでしまうので、自然増殖する細胞株を作る。

コールなどの薬剤や電気処理にて融合させるものである。

3. ヒト免疫担当細胞株を得るための細胞工学的手法とその実施例

われわれがヒト免疫担当細胞株を得るため、細胞融合法を応用したことは前項でお話した。まず、ヒト融合用親細胞株として、アミノプテリン感受性でかつ低細胞密度下、および無

血清培地中でも増殖可能な3種のクローン、ICLU-B(ヒトB細胞株), -T(ヒトT細胞株), -E(ヒト好酸球様細胞株)を新たに樹立し¹⁾、それらのヒト融合用親細胞株とヒト免疫担当細胞(末梢血リンパ球など)とを融合し、各種免疫担当細胞の株化を行った。従来、細胞融合法を用いる場合、抗体を作成することが主たる目的であったため、B細胞株を融合親細胞株として使用することが多かったが、今回は取得したい細胞に合った融合親細胞株を作

表1 ポリエチレングリコール(PEG)にレシチンを添加した場合のICLU-Tの融合効率の比較

融合条件	使用した融合親細胞数(個)	得られた融合細胞株数(個)	融合効率(×10 ⁵ 個あたり)
PEG	1×10 ⁷	2	0.02
	5×10 ⁶	0	0
	7×10 ⁶	1	0.01
PEG+1%レシチン	1×10 ⁷	48	0.48
	5×10 ⁶	9	0.18
	4×10 ⁵	8	0.20

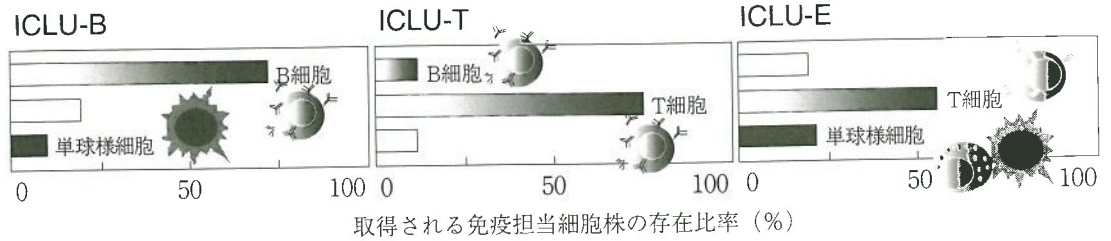


図2 3種のヒト融合パートナー細胞株 (ICLU-B,-T,-E) を用いて得られる免疫担当細胞株の種類

融合により得られる免疫担当細胞株は融合させる免疫担当細胞の性質を受け継いでいる。

製したことが大きな改良点である。また、血液中から分離したヒト末梢血リンパ球を、ダニ (Dermatophagoides Farinae) 抽出物抗原 (Mite-Df) と免疫活性化剤であるムラミルジペプチド (MDP)、インターロイキン (IL) - 2, 4, 6 を組み合わせて含む培地で培養して、IgE 抗体を産生する活性化リンパ球を誘導し、ヒト融合パートナー細胞株である

ICLU-B細胞と融合し、IgE産生細胞の株化を行った。

ヒト融合用親細胞株を用いて得られる融合細胞株の取得効率は、細胞を発ガン物質や放射線処理する従来法と比較して20倍以上の高い効率を示した。また、ICLU-Tを用いる場合、細胞融合後の生存率が悪いという欠点があったので、融合促進剤としてポリエチレングリ

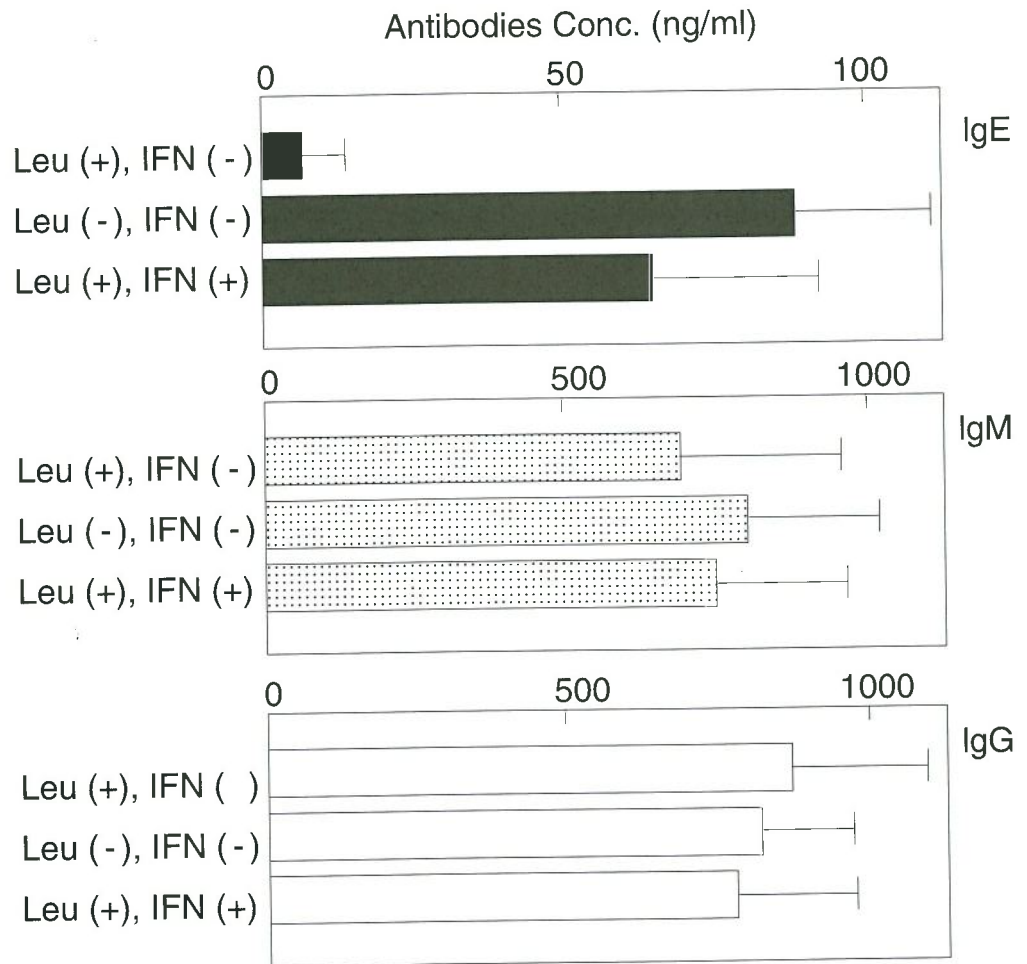


図3 ロイシルロイシンメチルエステル (Leu) 及びインターフェロン g (IFN) 処理が融合細胞株の抗体産生に与える影響

コールにレシチンを1%添加する方法を開発し²⁾,少なくともレシチンを添加しない場合の10倍以上に融合効率が上昇することを見出した(表1)。得られた融合細胞株の細胞種は,ICLU-Bを用いた場合にはB細胞由来の細胞株,ICLU-Tを用いた場合にはT細胞由来の細胞株が主であった。ICLU-Eを用いた場合はICLU-B,-Tの場合よりも高い確率で,単球,マスト細胞様の細胞株が取得された(図2)。この方法を用い,現在まで,アレルギーを促進する生理活性物質(サイトカイン)であるIL-4(インターロイキン4)を安定して産生するT細胞株及び高親和性IgEレセプタ(FcεRI)を発現しているマスト様細胞株(マスト細胞は血液中に存在していないので,さい帯血単核球を分離し,その細胞を生理活性物質で活性化した後,細胞融合を行った)を取得した。現在はこれらの融合細胞株の性状を検討している。

また,ヒトリンパ球をダニ抽出物抗原(Mite-Df)と免疫活性化剤であるムラミルジペプチド(MDP),インターロイキン(IL)-2,4,6を組み合わせて含む培地で培養する新たなIgE産生誘導法により,100ng/ml程度のIgEの産生誘導が可能となった(図3)。このリンパ球とICLU-Bとを融合して樹立したIgE産生細胞株は,ダニ抽出物と反応するヒト型IgEモノクローナル抗体を産生していた。通常,リンパ球の体外刺激では,刺激する細胞をロイシルロイシンメチルエステルで処理して,免疫抑制に働く細胞傷害性T細胞(CTL),サプレッサーT細胞(s-T)を除いた細胞集団を用いる場合が多かったが,IgEの効率的な産生には,取り除かない方がよかった。さらに,このメカニズムを検討するため,CTL,s-Tを除去した集団にインターフェロンガンマを添加したところ,除去していないリンパ球集団の抗体産生とほぼ同等の反応が得られた。したがって,IgE産生調節には,CTLおよびs-T細胞とインターフェロンガンマの関与が示唆された³⁾。以上のことか

ら,樹立したヒト免疫担当細胞株を用いて複合培養系を構築することにより,効率的な食品の抗アレルギー性検定や免疫反応への影響の解析が可能となると考えられる。

4. おわりに

食品中の抗アレルギー性物質を検索したり,免疫反応への影響を解析するためには,安定に機能するヒト免疫担当細胞が不可欠になる。われわれは,様々な融合親細胞株と生体内細胞を細胞融合することにより,B細胞,T細胞,顆粒球などの細胞株が樹立できることを見いだしてきた。今後は,免疫反応に関与する様々なヒト細胞株をラインナップ化し,試験管内で免疫反応がモデル化するような評価系を構築していきたいと考えている。

現在,実験動物を使うことに関しては,代替法を模索する大きな動きもあり,今後は機能性成分の一次検索には,このようなヒト細胞株を用いることが必須になってくると思われる。生体組織のモデル化(人工臓器),細胞層のモジュール化など動物細胞工学上の飛躍的な発展を期待したい。

本研究は生研機構基礎研究推進事業の助成を受けて行っている。この場をかりて深く感謝する。

文献

- 1) Kawahara H., Maeda-Yamamoto M., Suzuki M., Hakamata K.: New human fusion partners, ICLU-B, -T, -E for making human hybridomas derived from various immunological cells, *Human Antibodies*, 7, 17-22 (1998)
- 2) Kawahara H., Maeda-Yamamoto M., Hakamata K.: Establishment of a human fusion partner or making human T-T hybridomas which can grow in serum free medium, *Human Antibodies*, 6, 11-15 (1998).
- 3) Kawahara H., Maeda-Yamamoto M., Suzuki M., Hakamata K.: Effective induction and acquisition of human monoclonal IgE antibodies reactive to house dust mite extracts, *J. Immunol. Method*, 233, 33-40 (2000).

◀国内情報▶

トランスポゾンによる植物遺伝子
タギング法の確立町田千代子, 田中博和, 岩川秀和, 町田泰則
名古屋大学大学院理学研究科

トランスポゾンとは DNA 上のある部位から他の部位へ転位する特定の長さをもつ遺伝因子である。ランダムな位置に転位し、挿入、欠失、逆位などの DNA 組換えを誘導し、ゲノムの再編成や進化に重要な役割を果たしていると考えられている。近年、挿入変異体の作製や遺伝子のタギングなど広く遺伝子操作に応用されている。我々は、トウモロコシのトランスポゾン *Ac* をシロイヌナズナに導入し、挿入、欠失等の様々な染色体操作を誘導できる系を作製した。ここでは、この系を用いた、葉の形態形成に関与する遺伝子クローニングの例を紹介する。

はじめに

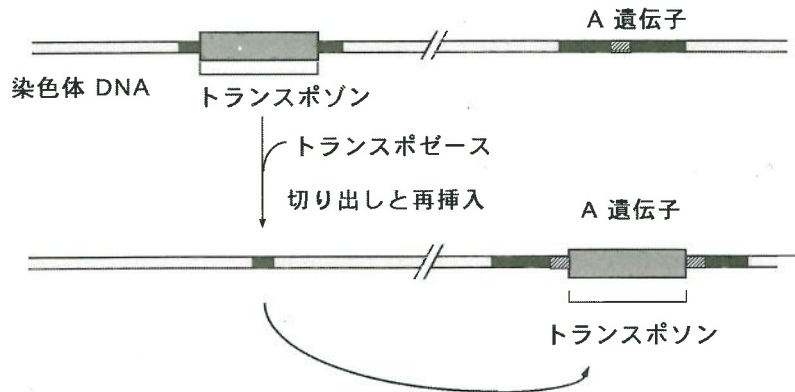
動く遺伝因子(トランスポゾン)の概念は、1940年代にMcClintockによってトウモロコシの遺伝学的研究から提唱された。McClintockは、ある遺伝因子(*Ac*)が染色体上の特定の部位を切断する機能を持ち、しかも、それ自身が染色体上のある部位から他の部位へ移動することを示唆した。その後の研究からトランスポゾンは生物に普遍的に存在する遺伝因子であることが示された。また、トランスポゾンは近年、遺伝子操作に応用され、遺伝子機能の解析にはなくてはならない道具となっている。特に、Coenらによるキンギョソウのトランスポゾン *Tam* 因子による花芽の分化に関わる遺伝子クローニングの成功は、植物形態形成の理解における新しい概念をつくり、植物分子生物学の新しいページを開いた。また、この十年余りの間にトウモロコシのトランスポゾン *Ac* や *Spm* をシロイヌナズナやトマト、タバコ、イネ等に導入し、これらの異種植物においても転位が誘導されることがわかり、得られたトランスポゾン挿入突然変異株から変異の原因遺伝子をクローニングする試みがなされてきた¹⁾。なかでも、トマ

MACHIDA Chiyoko, TANAKA Hirokazu, IWAKAWA Hidekazu, MACHIDA Yasunori
〒464-01 名古屋市千種区不老町

コの *Cf9* やタバコの *N* 遺伝子等の抵抗性遺伝子の単離は、病原体感染に対する抵抗性反応の分子メカニズムの解明の突破口となった。

1) トランスポゾンタギングの基本的な原理と特徴

トランスポゾンタギングの基本的な原理を図1に示した。トランスポゾンが特定の遺伝子に挿入され、その遺伝子機能に影響を与えた場合に、突然変異株が得られる。遺伝子はトランスポゾンにより印付け(タギング)されるのでトランスポゾンをプローブとして変異の原因遺伝子のクローニングが可能となる。トランスポゾンは、次のような3つの特徴をもつ。第一に復帰変異体を単離できるという利点がある。トランスポゾンが再び切り出され、変異の表現型が野生型にもどる復帰変異体を得られればタギングされたものが変異の原因遺伝子である強い証拠になる。第二に、トランスポゾンは近傍に転位しやすい性質をもつことが知られており、トランスポゾンの元の位置の近傍の遺伝子に着目して突然変異株を得ることができる。第三に、トランスポゼースが供給された時のみトランスポゾンの転位を誘導するいわゆる two element system が可能であり、転位をコントロールできる点である。筆者らは、シロイヌナズナに *Ac* を導入し、



■ ▨ は重複した標的部位を示す。

図1 トランスポゾンタギングの原理

トランスポゾンがある遺伝子 (A 遺伝子) に挿入され、表現型に何らかの変化があった場合に挿入による突然変異株が得られる。A 遺伝子はトランスポゾンをプローブとしてクローニングが可能である。また、トランスポゾンが挿入されると、挿入部位の数塩基対の配列 (Ac の場合は 8 bp) が重複される (標的部位の重複)。トランスポゾンが再び切り出された場合に、切り出し部位で数塩基対の欠失や付加がおり、痕跡 (フットプリント) を残す場合がある。トランスポゾンが切り出され、表現型が野生型にもどった場合に復帰変異体 that 得られる。

トランスポゾン挿入部位の近傍の遺伝子を効率よく単離する系を開発した^{1,2)}。さらに、この系には味噌醤油酵母の R-RS 部位特異的組換え系を導入してあるが^{3,4)}、ここでは、トランスポゾンに話をし、筆者らの最近の研究を紹介する。

2) トランスポゾンの転位パターン

Ac が同一染色体上の近距離に転位しやすい性質を利用して、近傍の遺伝子を単離するためには、Ac が実際にどのくらいの割合で同一染色体上のどのくらい離れたところに転位するかを知ることが重要である。そこで Ac の内側と外側にそれぞれ、18 bp からなるエンドヌクレアーゼ I-SceI の認識部位を挿入した (図 2) (このようなトランスポゾンを dAc-I-RS, T-DNA を (I-RS/dAc-I-RS) T-DNA と呼ぶ)。この 18 bp の配列が出現する頻度は 7×10^{10} (4^{18}) に 1 回である。シロイヌナズナのゲノムサイズが 10^8 bp/ハプロイドゲノムであることから、計算上はシロイヌナズナ染色体上には I-SceI の認識部位は存在する確率は低いと予想される。従って、図 2 に示すように、I-SceI による切断で出現する DNA 断片の長さは、この因子の転位した距離に相当すると期待される。まず、転位した dAc-I-RS をもつ植物体か

ら高分子 DNA を抽出し、I-SceI で切断した後、パルスフィールドゲル電気泳動で分離し、サザンハイブリダイゼーションを行った。図 2 のプローブ 1, 2 を用いて、それぞれ図の左側と右側に転位した dAc-I-RS の転位距離を測定した。(I-RS/dAc-I-RS) T-DNA が第一染色体 (地図位置 80) に挿入された系統 #14 を出発材料として、dAc-I-RS が転位した 60 系統をランダムに選んで転位距離の測定を行なったところ、図 3 に示したように、60 系統中 31 系統、つまり 52% が同一染色体上 1700 kb 以内の近距離に転位していることがわかった^{2,5)}。また、約 35% は 200 kb 以内のきわめて近傍に転位していることを示した。また、距離が測定できなかったものについては遺伝的な連鎖解析を行なった。これらの結果は全体の約 75% が同一染色体上に転位したことを示した。筆者らは、#14 系統以外にさらに 2 系統について同様の解析を行ない、#14 系統とほぼ同じ結果を得た。従って、Ac はシロイヌナズナの染色体のどこでも、図 3 に示したようなパターンで転位していると考えられる。

3) トランスポゾンタギングによる

Abnormal-Leaf Shape 1 (ALE1) 遺伝子のクローニング

私達は葉という器官が未分化な分裂組織か

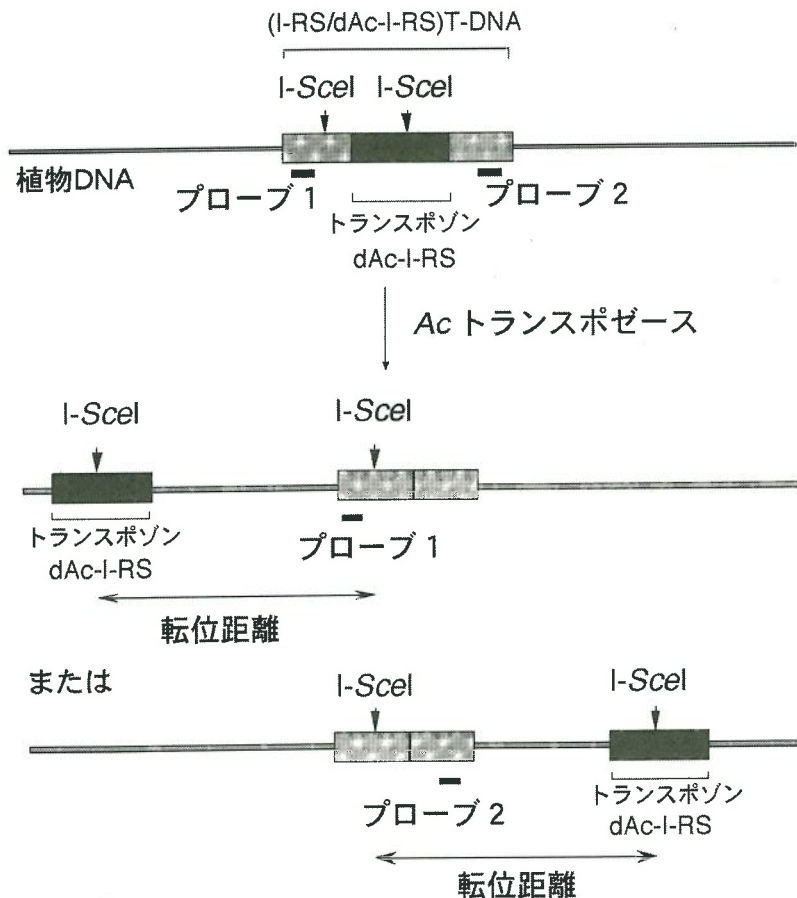


図2 トランスポゾンの転位距離測定法の原理

トランスポゾン dAc-I-RS の内部と外部にそれぞれ、18 bp からなる I-SceI の認識部位をもつ (I-RS/dAc-I-RS)T-DNA を植物染色体に導入した。次に Ac トランスポゼース遺伝子を導入して転位を誘導した。高分子 DNA をエンドヌクレアーゼ I-SceI で切断し、パルスフィールドゲル電気泳動で分離し、サザン解析を行った。得られた DNA 断片の長さがトランスポゾン dAc-I-RS の転位距離となる。プローブ 1 を用いると、図の左側、プローブ 2 を用いると図の右側に転位した場合の転位距離を測定できる。

らどのようにつくられるかという点に興味をもち研究している。そこで、ここで作製したラインを用いて、葉の形態異常の変異体をスクリーニングした。まず、第一染色体地図位置 80 に導入された dAc-I-RS を持つ系統を出発材料として、トランスポゾン挿入ラインを作製し、葉の形態に異常を示す変異体をスクリーニングした。その結果、もとの位置からテロメア側に 160 kb 離れた部位に dAc-I-RS が転位した株が、葉の形態異常を示すことがわかり、これを *abnormal leaf shape1 (ale1)* と命名した (図 4)。*ale1* 変異体は子葉や葉の表面が波打ち、表皮細胞が細長く肥大化していた。葉の内側にある葉肉細胞も一部変形していた。また、*ale1* 変異体では、葉と葉、葉と茎の合着がみられ、合着部では表皮細胞の性質が失なわれていることがわかった。これらの結果

から、*ALE1* 遺伝子は表皮細胞の分化に関わっていると考えられた。遺伝学的解析から、*ale1* 変異は、転位した dAc-I-RS に強く連鎖し、劣性変異であることがわかった。*ale1* 変異体の後代をスクリーニングしたところ、表現型が野生型に戻った復帰変異体が二系統得られた。変異体における dAc-I-RS 周辺のゲノム構造と復帰変異体におけるゲノム構造を調べた (図 4)。その結果、*ale1* 変異体では dAc-I-RS 挿入部位に 8 bp の重複が認められた。一方、二つの復帰変異体では、dAc-I-RS は切り出されており、そのあとにそれぞれ 3 bp、6 bp のフットプリントが認められた。このことは、*ale1* 変異は、トランスポゾンの挿入が原因であることを示している。そこで、dAc-I-RS 挿入部位周辺の DNA 塩基配列を決定したところ、この領域はズブチリシンファミリーに属

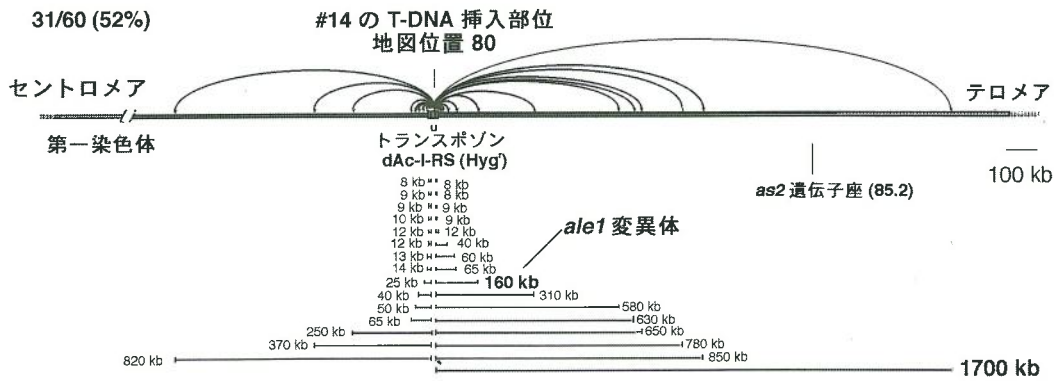


図3 トランスポゾン dAc-I-RS の転位距離を測定して作製した物理的転位マップ (I-RS/dAc-I-RS)T-DNA がシロイヌナズナ第一染色体地図位置80付近に挿入された系統(#14)を出発材料として、トランスポゾンの転位を誘導し、転位距離を測定した結果を示している。kb は、パルスフィールドゲル電気泳動で測定した転位距離を示す。

すセリンプロテアーゼ様タンパク質の遺伝子をコードしていることがわかった。また、*ALE1* 遺伝子の発現を調べたところ、胚形成時の心臓型胚から魚雷型胚にかけて胚乳細胞で発現しており、胚や成熟葉では mRNA の蓄積が認められなかった。このことから、*ALE1* 遺伝子は胚発生の過程で子葉や葉原基が分化する時に働いている可能性が考えられた。葉の正常な細胞分化のためには、ある種のタンパク質の切断が必要であり、切断されたペプチドが胚の細胞分化に関与している可能性が考えられる。

5) トランスポゾンの転位距離マップを利用した *AS2* 遺伝子のクローニング

asymmetric leaves2 (*as2*) は、1960年代に

Rédei によって分離された変異体である。*as2* 変異体では葉の左右相称性がくずれており、葉身に異常な切れ込みがはいったり、片側にだけ小葉のような葉が形成される(図5)。また、葉脈の分岐も左右相称性がくずれている。地球上の植物の葉の多くは単葉複葉にかかわらず、左右相称的な形をしている。*asymmetric leaves* 変異体の存在は、葉を左右相称的につくる積極的なメカニズムがあることを示唆しており、我々はこのような葉の形成の分子機構を解明したいと考え、上記したトランスポゾンが転位した複数の系統を利用し、*AS2* 遺伝子のクローニングを試みた。当初は *AS2* 遺伝子座に dAc-I-RS が挿入された株を探したが得られなかった。しかし、*AS2* 近傍に転位した系統が複数得られたので、そこから染色体歩行により *AS2* 遺伝子に近づくことにした。

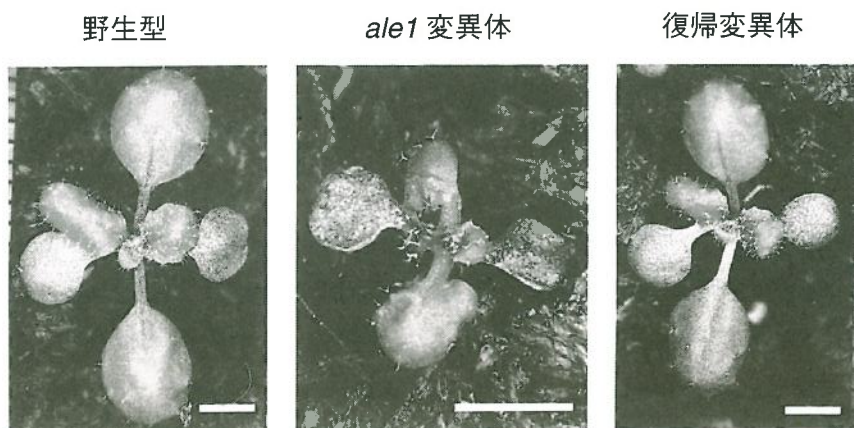


図4 シロイヌナズナの *ale1* 変異体と復帰変異体。播種後18日目の植物体。スケールバーは300 mm。

トランスポゾンdAc-I-RSはハイグロマイシン耐性マーカーをもつので、dAc-I-RS挿入部位は遺伝的マーカーとして使うことができ、染色体歩行を容易にした。最終的に、AS2遺伝子座の領域を約30 kbの範囲までしぼり込み、塩基配列の解析によりAS2遺伝子を同定した。AS2遺伝子がコードするタンパク質は、システインに富む領域をもち、植物にしか存在しない新奇なタンパク質ファミリーを形成する可能性が示唆された。AS2は、葉原基で発現しており、葉形成の初期に働き、葉の左右相称の形成に重要な役割をはたしていると考えられる。

おわりに

トランスポゾンの場合には、転位再挿入を誘導でき、復帰変異を単離することも可能であり、近傍に転位する性質を利用して一つの変異株から複数の対立遺伝子を単離することも可能である。また、復帰変異が得られる頻度が高い場合には、キメラ解析により、遺伝子の機能をさぐることもできる。世界のいくつかのグループでAc-Ds系やEn-Spm系をシロイヌナズナに導入し、トランスポゾン挿入ライブラリーを作製している。我々は、現在、

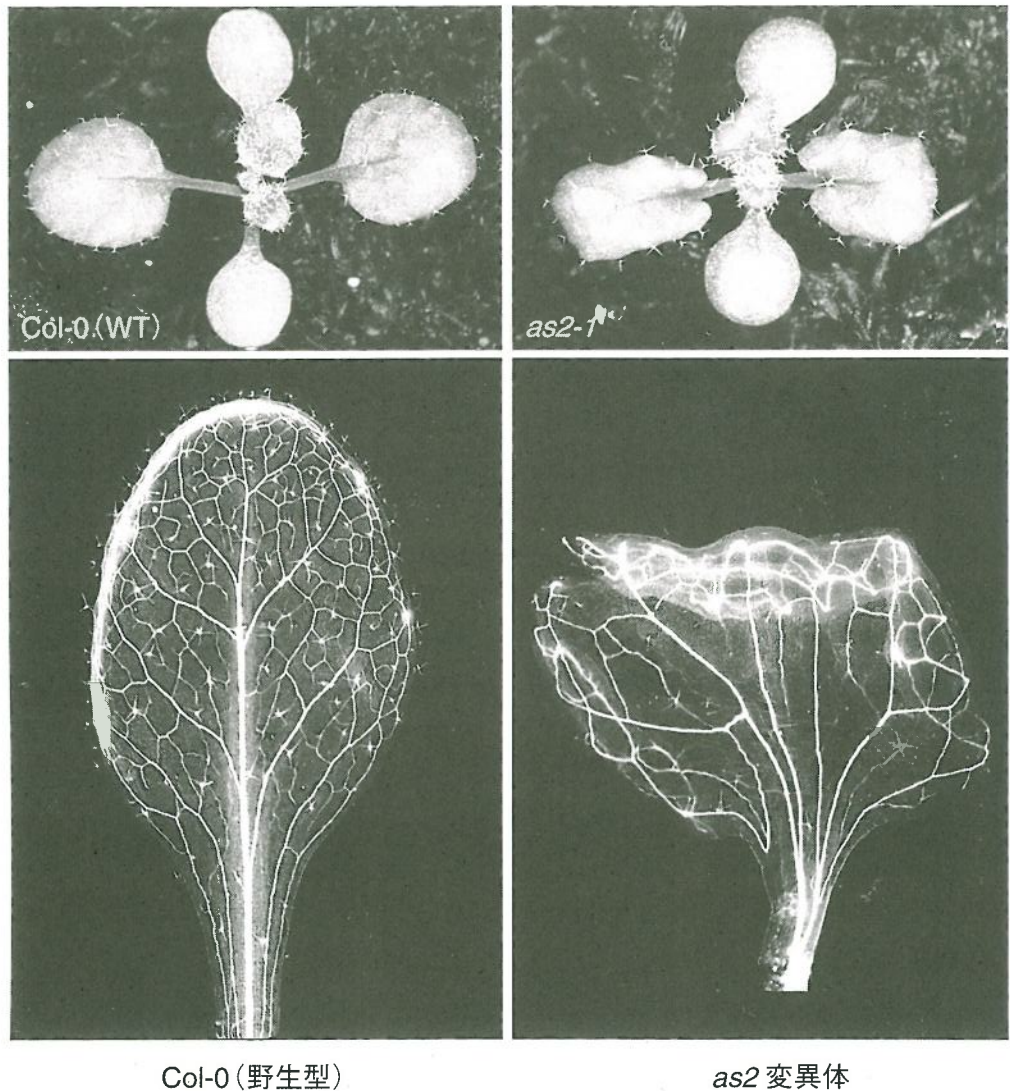


図5 *asymmetric leaves2(as2)* 変異体の葉の形態と葉脈

上段は播種後16日目のシロイヌナズナ野生株 *as2* 変異体を示す。下段は播種後23日目の野生株 *as2* 変異体のロゼット葉を固定化した後、透明化液（抱水クロラル：グリセロール：水＝8：1：2）で処理し、暗視野顕微鏡で観察した図を示す。*as2* 変異体の葉の形は左右相称性に異常があり、主脈が明瞭でない（Endang & Machida 未発表データ）。

一コピーの (I-RS/dAc-I-RS) T-DNA をもつ約50ラインについて染色体上にマップしている。目的とする遺伝子の近傍に *Ac* (*Ds*) が挿入されたラインがあれば、かなりの確率で挿入変異株が得られることが期待される。また、*AS2* 遺伝子クローニングの例でも示したように、トランスポゾンに薬剤耐性等のマーカールをもたせることにより、マップを基礎とした遺伝子クローニングを容易にする。2000 年中には、シロイヌナズナの全ゲノム配列が決まる予定であり、トランスポゾンを利用する方法はますます重要性が増すと考えられる。

文献

- 1) 町田千代子, 尾之内均, 浜田進 (1996) トランスポソントギング化学と生物 34: 617-623
- 2) Machida C., Onouchi H., Koizumi J., Hamada S., Semiarti E., Torikai S. and Machida Y.: Characterization of the transposition pattern of the *Ac* transposable element in *Arabidopsis thaliana* using endonuclease I-*Sce*I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8675-8680 (1997)
- 3) Onouchi H., Nishihama R., Kudo M., Machida Y. and Machida C.: Visualization of site-specific recombination catalized by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 427, 653-660 (1995)
- 4) Machida C., Onouchi H., Endang S., Ishikawa T., Machida Y. Use of the R-RS site-specific recombination system in plants. *Plant Molecular Biology Manual N2*, 1-23 (2000) (ed. by Gelvin, S.B.) published by Kluwer Academic Publishers (Netherland)
- 5) 町田千代子, 尾之内均, 小泉順, 町田泰則 (1996) シロイヌナズナ染色体のメガスケールの解析法細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ 4: 157-164

◀地域の先端研究▶

薬剤を必要としない新規選抜マーカー遺伝子の開発 —チャにおける利用—

静岡県立大学大学院 食糧細胞工学研究室

丹羽 康夫

遺伝子組み換え技術は、人類にとって非常に有用であるにもかかわらず、既存の方法では利用できる植物種に限りがある。この問題の最大の原因は、適切なマーカー遺伝子がなかったためである。そこで緑色に自家発光するクラゲのタンパク質に着目して、植物細胞内で利用できるよう改良を施した。その結果、従来法の問題点を克服可能な選抜マーカーとして利用できることが明らかとなった。このマーカー遺伝子は、新品種作出には遺伝子組み換え技術が必須であるチャにおいても有効に利用できることを明らかにした。

1. はじめに

来るべき21世紀に向けて、人類が直面する環境問題や食糧問題は、解決すべき最重要課題となっている。植物はいずれの問題にも深く関わっており、その改良が問題解決の鍵を握っている。特に遺伝子組み換え技術の登場により、従来の育種技術では成し得なかった品種の作出や改良も可能となった。ところが残念なことに、遺伝子組み換えは、ごく限られた植物においてのみ成功しているというのが現状である。このことは、適切な選抜システムが存在していないことが大きな原因の一つである。そこで自家発光するクラゲのタンパク質に着目し、植物で利用できるよう改良を試みた。ここではその改良と、チャにおける利用例を紹介する。

2. 既存法による遺伝子導入の問題点

植物において遺伝子組み換え技術を利用するためには、越えなければならない二つの大きな壁がある。一つめは、植物種個々における再生系の確立であり、二つめは遺伝子組換え体の選抜条件の確立である。これまでに多くの研究者の努力により、チャも含め様々な植物についての再生系は確立されてきた。

Niwa Yasuo

〒422-8526 静岡市谷田52-1

ころが遺伝子組換え体を選抜、再生する段階で、マーカー遺伝子として抗生物質等の薬剤抵抗性遺伝子を利用しているため、薬剤を添加した選択培地上で個体再生を行う必要がある。その結果、再生効率が著しく低下する、もしくは再生個体が全く得られないといった問題に直面することがしばしばである。この問題の解決には、従来の方法とは異なり、薬剤による選抜圧をかけない新規な選抜マーカーの開発が必要とされてきた。

3. チャの特徴

静岡県の代表的な特産物の一つであるお茶は、多くのすぐれた効能が科学的にも確かめられるようになり、健康食品としても大いに注目されるとともに、さらにすぐれた品種の



図1 当大学近くに植えられている「やぶきた」種の母樹、やぶきた種は70%以上の茶園で栽培されている。

作出や改良の必要性が高まってきた。昨今クローン動物が大きく取り上げられているが、チャは何十年も前から栄養繁殖である挿し木、言い換えればクローンとして増殖させてきたことから(図1)、交配による従来の育種法で新たな品種を作出することには原理的な限界があった。すなわち一度種子繁殖を行うと、育成品種の特徴が維持できないことが、これまでチャの品種改良を困難にしてきた。ところが、遺伝子組み換え技術によれば、この問題は克服できるため、チャの品種改良において、遺伝子組み換え技術の確立は、必要不可欠であると位置付けられる。

4. 新規マーカー遺伝子の開発

オワンクラゲから単離されたgreen fluorescent protein (GFP; 緑色蛍光タンパク質)は、その名が示すように、長波長紫外線もしくは青色光で励起することによって、緑色の蛍光を発する(図2)。この発光には、基質やコファクターを必要としない点で、従来のレポーターシステムとは全く異なる。この優れた特徴を備えたGFPを植物におけるマーカー遺伝子として利用すべく、早速利用を試みた。ところが野生型GFPには、植物で利用する上でいくつかの問題があることが明らかになった。すなわち、1)不適切なイントロンの存在、2)コドン使用の偏り、3)改善すべき蛍光特性

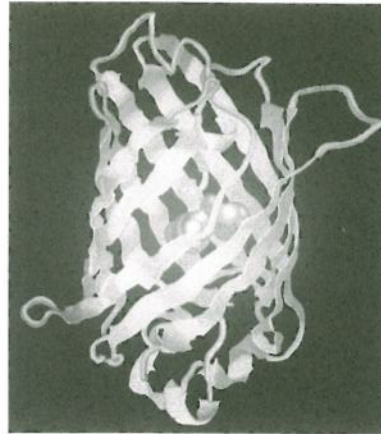


図2 GFPタンパク質の立体構造と発光している様子の模式図

などである。そこで、マサチューセッツ総合病院のJen Sheen博士との共同で、GFP遺伝子の改良を試みた。具体的には、遺伝子の全領域を植物での利用に適するよう人工的に合成し、さらに発色団を形成する65番目のアミノ酸をセリンからトレオニンに置換した。その結果、これまでの問題点は全て解決することができ、最終的には改良前の野生型GFPと比較して、蛍光強度として100倍以上増強した植物用GFP (sGFP(S65T)と命名)の開発に成功した。sGFP(S65T)は、これまでに多くの植物においてその有効性が確認されている。さらにイネ、タバコ、シロイヌナズナに関しては、遺伝子組み換え植物の作製にも成功しており、形質転換植物における有用性も証明することができた(図3)。

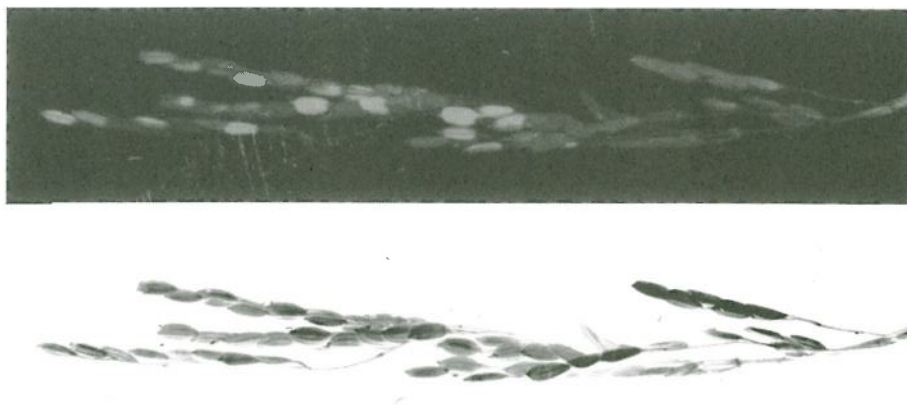


図3 sGFP(S65T) 遺伝子組み換えイネ
青色レーザー励起光下におけるsGFP(S65T)の蛍光像
(上段)および全体像(下段)

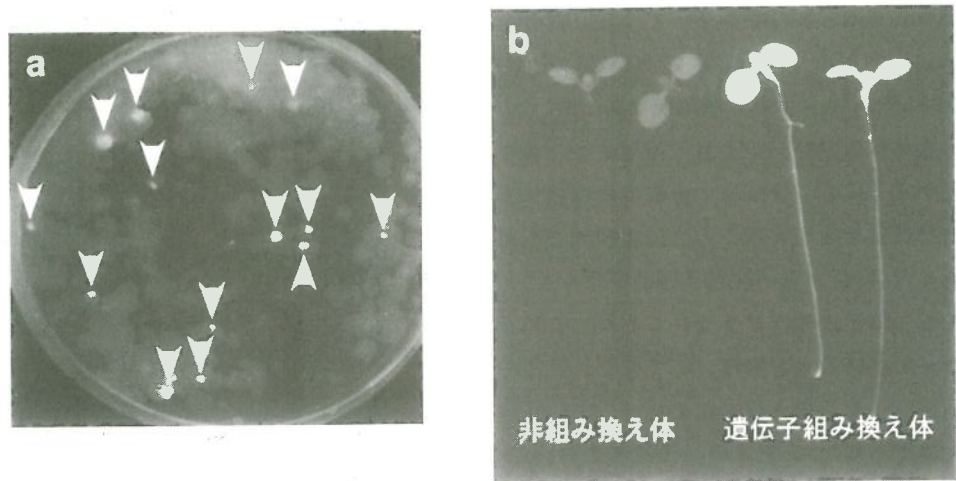


図4 sGFP(S65T)が導入されたタバコ培養細胞 (a: 矢印で示す) とシロイヌナズナ (b)

タバコ培養細胞は、非選抜培地上で生育させている。いずれも蛍光イメージャーで検出した画像であるため、蛍光値を定量解析することができる。

5. 遺伝子組み換え植物作製時における植物用改良型 GFP の利用

植物用改良型 sGFP(S65T) を遺伝子組み換え植物作製時にマーカーとして用いた場合、遺伝子導入に用いた植物細胞を生かした状態で、しかも原理的には1細胞の段階から遺伝子導入が緑色蛍光によって確認可能である。さらに、sGFP(S65T) が既存の蛍光色素である FITC の蛍光特性と酷似している点を利用して、蛍光イメージャー (FluorImager; アマシャム ファルマシア バイオテック) を用いることで、一度に多数の遺伝子組み換え細胞について、非破壊で蛍光定量検出する方法を確立した (図4)。これまでの薬剤抵抗性遺伝子を用いた選抜法では、先に触れた再生効率の著しい低下といった問題の他にも、直接形質転換した細胞を識別できないため、遺伝子組み換え植物を作製するためには、多大な時間・労力・経費・場所を必要としてきた。ところが、sGFP(S65T) 遺伝子および蛍光イメージャーを用いた選抜方法を利用することで、遺伝子導入初期段階で、形質転換した細胞を確実に選抜することが可能となり、これまでに指摘した問題点はもちろん、形質転換された細胞とされていない細胞とが混在するキメラの問題も含め、それらを全て解決することが可能

となった。

6. チャにおける有効性の検討

これまでの成果をふまえ、チャにおいて sGFP(S65T) が有効に利用可能かどうかの検討をおこなった。チャの抗菌作用は、我々の日常生活において、しばしば役立てられているが、植物の形質転換法の代表的な方法である土壌細菌のアグロバクテリアを用いる場合には不都合を生じる。そこでここでは、導入する遺伝子をコーティングした金属粒子をヘリウムガス圧で飛ばし、植物細胞中へと導入できるパーティクルガン法を用いた。図5 a に示すように、sGFP(S65T) 遺伝子が導入された細胞は、青色光励起下で緑色の蛍光を発生 (中列)、非導入細胞における葉緑体の赤色自家蛍光 (左列) と明瞭に区別できるという結果が得られ、チャにおいても sGFP(S65T) が優れたマーカーとして利用可能であることが確かめられた。植物に新たな機能を付加する場合、目的のタンパク質は細胞内の特定のオルガネラに局在させる必要がある例が少なからず見受けられる。そこで、核、葉緑体、ミトコンドリアについて、任意のタンパク質を局在させることが可能かどうかの検討も行った。図5 b~d の結果から明らかのように、核

(b, 葉緑体より大きく細胞内に1個のみ存在), 葉緑体 (c, 遺伝子導入された右側の細胞で, 緑色蛍光シグナルが葉緑体の赤色自家蛍光と一致している), ミトコンドリア (d, 葉緑体より小さく細胞内に複数存在) へGFPを局在させることが可能であった。

以上の実験結果をもとに, 現在, 静岡県茶業試験場との共同研究として, チャにおける遺伝子組み換え技術の確立を目指している。

7. おわりに

ここで紹介した植物用改良型 GFP である sGFP(S65T) 遺伝子は, イネ, コムギ, ダイズ, ニンジン, トマト, ユリ, バラ, キク, メロン, クワ, ポプラ, スギ等々でも有効に利用されている。今後これらも含め, さらに多くの作物における遺伝子組み換え技術確立の

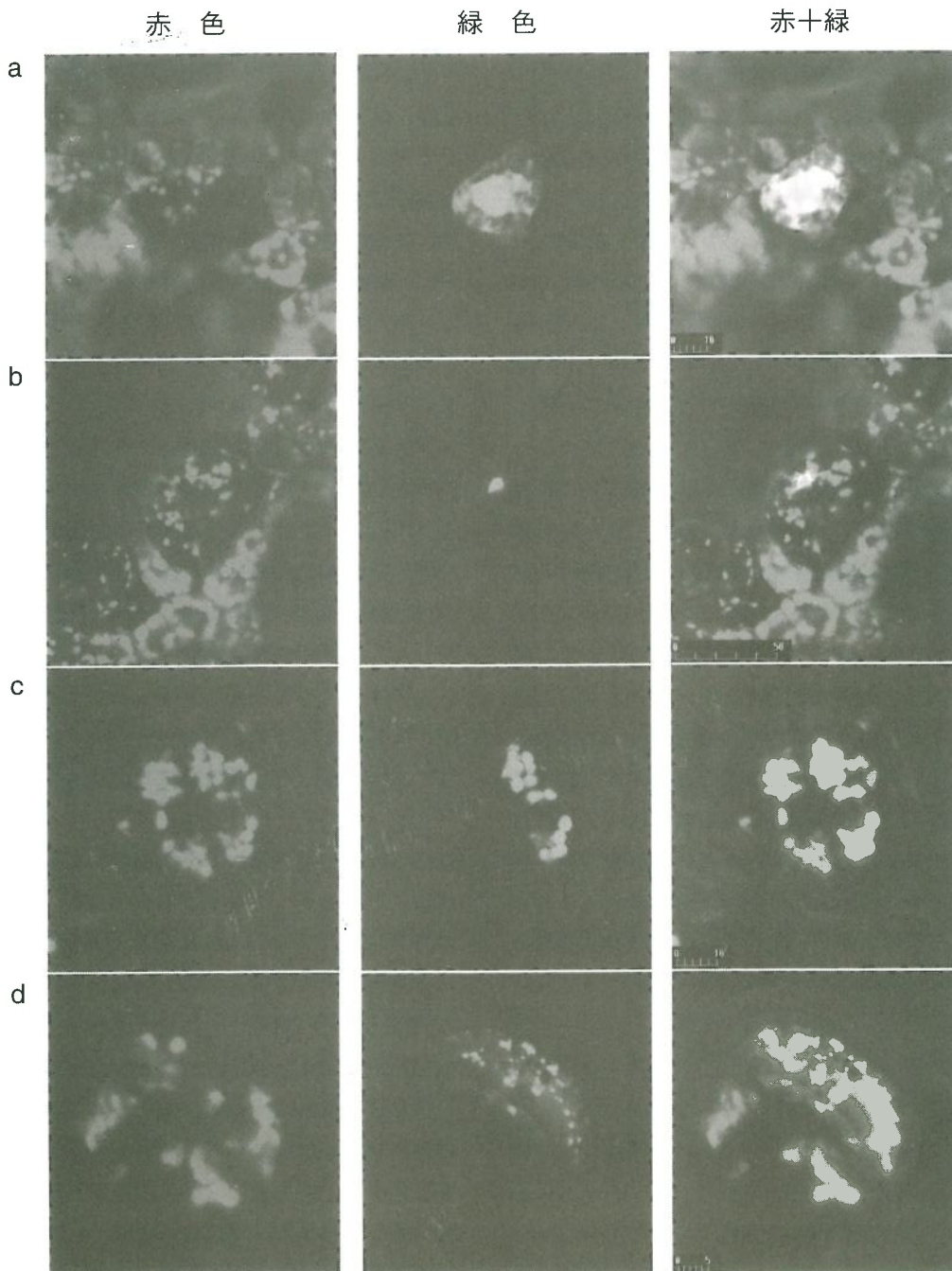


図5 チャ葉における sGFP(S65T) の発現

ために有効利用されることを願っている。

謝辞

チャに関する情報をご教授いただいた青島洋一博士（静岡県茶業試験場育種研究室）と、形質転換イネをご提供いただいた伊藤幸博博士（国立遺伝学研究所植物遺伝研究部門）に厚く感謝する。

文 献

- 1) J. Sheen, S. Hwang, Y. Niwa, et al., (1995) Plant J. 8, 777-785.
- 2) W-I. Chiu, Y. Niwa, et al., (1996) Current Biology 6, 325-330.
- 3) Y. Niwa, et al., (1999) Plant J. 18, 455-463.
- 4) 丹羽康夫(1996)「モデル植物の実験プロトコール」117-121, 植物細胞工学シリーズ4, 秀潤社
- 5) 丹羽康夫 (1997)「植物の細胞を観る実験プロトコール」116-122, 196-199, 植物細胞工学シリーズ6, 秀潤社
- 6) 丹羽康夫 (1998) Plant Morphology 10, 22-29.
- 7) 丹羽康夫, 久留戸涼子 (1999) Life Science News, No.4, 5-7.

卵細胞質内精子注入 (ICSI) 法 による哺乳動物の遺伝子導入

Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection

Anthony C. F. Perry, Teruhiko Wakayama, Hidefumi Kishikawa, Tsuyoshi Kasai, Masaru Okabe, Yutaka Toyoda, Ryuzo Yanagimachi
Science, 284:1180-1183 (1999)

遺伝子組換え技術の発達とともに、1980年アメリカのGordonらによりマウス受精卵の前核に遺伝子を注入（マイクロインジェクション, MI）するとそれが染色体に組み込まれることがはじめて示され、トランスジェニック (tg) マウスが誕生した。以来tg動物は実験動物における特定遺伝子生体機能の個体レベルでの解析のみならず産業動物への応用などその役割を拡げつつあるが、現在に至ってもその作出方法はMI法が実用的に使われている。しかしMI法では導入遺伝子発現の精密な制御やtg個体の最終的な作出効率に限界があり、この間も効率的かつ実用的なtg動物作出法の開発が試みられている。MI法以外の方法として遺伝子組換えレトロウイルスやアデノウイルスを胚細胞へ感染させる方法、遺伝子導入した胚性幹細胞を利用しキメラ個体を得る方法、精子ベクター法、近年有力なtg動物作出のツールとして注目されている遺伝子導入した体細胞の核移植法などが上げられる。

本論文は精子ベクター法に基づく新たなtg動物の作出法を示している。まずマウスの精子上体尾部より得られた精子をTriton X-100、凍結融解あるいは凍結乾燥の3区で処理を行うことで精子頭部膜（先体膜）を欠損させた。この精子を green fluorescent protein (GFP) あるいは β -galactosidase (LacZ) をリポーター遺伝子を持つプラスミドベクター由来のDNA断片と室温あるいは氷上で1分間共培養した後、精子頭部と外来DNAを第二分裂中期のマウス卵子にICSIを行った。その結果新鮮精子をGFP遺伝子を含むDNA断片と共培養

後ICSIした場合のGFP発現細胞を持つ胚の割合が26%であったのに対し、精子頭部膜欠損処理区では64-87%であった。同様にLacZ遺伝子を含むDNA断片と処理区の精子を共培養した場合LacZ発現胚は92-94%であり、いずれも精子処理区で導入遺伝子の発現率が高かった。さらにこのような方法でGFP遺伝子の導入を行った胚を桑実-胚盤胞期でランダムに仮親に移植したところ、産仔の17-21%がGFPを発現していた。これらの結果は精子頭部膜の欠損が外来DNAの宿主染色体への組み込みをサポートすることを示していた。この理由として精子頭部膜の欠損により外来DNAの精子頭部表面への付着が促進される、あるいは高度に凝縮した精子核DNAへの結合が可能になるなどが考えられている。

1989年イタリアのLavitranoらによってマウス精子をDNA断片と共培養した後に体外受精に用いその受精卵を移植した結果、導入遺伝子を持つ産仔が得られかつその遺伝子の発現がみられたことが発表されている。しかしその後いくつかの研究機関による精力的な追試にもかかわらず、結果の再現性は確認されなかった。本論文のPerryらの方法は外来DNAとの共培養の前に精子頭部膜を除いたICSIを行う点でLavitranoらの方法と異なっているものの、tg動物作出への精子ベクター法によるアプローチを力強く後押しするものとなった。今後実用化の可能性にむけて、ICSI法（本来はヒトで不妊治療を主目的とし行われているもの）の他動物種への応用、最終的にはこの精子ベクター法とMI法をはじめとするその他のtg動物作出法との効率の比較が課題とされる。

(抄訳: 木村直子 東北大学大学院農学研究科)

◀文献情報▶

ミトコンドリアDNAは酵母染色体の二重鎖の破損を修復する

Mitochondrial DNA repairs doublestrand breaks in yeast chromosomes

Miria Ricchetti, Cecille Fairhead, and Bernard Dujon

Nature, 402: 96 - 100, (1999)

真核細胞の中でミトコンドリアDNAはゲノムDNAに依存しながらも、核とは別個に、ミトコンドリアの中に存在し維持されている。

真核細胞の起源に関しては、原始真核細胞の中に好気性真性細菌が侵入し、その真性細菌がミトコンドリアに退化し細胞内共生することで真核細胞が誕生した、とする内部共生説が有力である。内部共生説では遺伝子情報は細胞のミトコンドリアから核へ運ばれうるとし、ミトコンドリア起源と見られる遺伝子が核の染色体ですで見つかっている。そしてミトコンドリアDNAと相同な短い塩基配列や再編成した塩基配列が、酵母や植物、ヒトなど多様な生物の染色体で見られることがある。M. Ricchettiらは本報文で、一倍体有糸分裂酵母細胞の中で2重鎖DNAの切断破損が修復される時、ミトコンドリアDNAの断片が酵母染色体に移入されることを見出し、その機構について考察した。

一般に酵母 *S. cerevisiae* においては、2重鎖DNA破断が修復される時、その90%は相同的な組み換えにより修復され、他は非相同的、そしてまれに（非相同的な修復のうち1%程度）短いレトロトランスポゾン配列の挿入により修復される。M. Ricchettiらは *URA3* カセットの両側に制限酵素 *I-SceI* の認識部位をつけたものを酵母染色体に組み込み、制限酵素 *I-SceI* をコードする遺伝子を一定の条件下で発現させることで、染色体上の *I-SceI* 部分を意図的に切断破損させた。そして修復により回復してきた酵母を集め、その部分にどのような修復がされたか調べた。結果、ランダムに選抜した7株のうち5つのものにミト

コンドリアDNA配列と一致するDNAが挿入されていた。うち3つは47, 77, 97bpのミトコンドリアDNA断片をそれぞれ1つ、他の2つはミトコンドリアDNA上の異なる配列を2つ含んでいた。

そこであらためて既知の酵母核ゲノムのDNA配列を調べてみたところ、16本の染色体のうち13本の染色体上に、計34ヶのミトコンドリア起源の塩基配列（長さ22 - 230bp）の存在が確認された。ほとんどのミトコンドリア起源の配列はそれぞれ1つずつの存在であるが、4つの配列に関しては違った染色体上にそれぞれ2つずつ存在していた。これらの配列は、先の実験で得られた2重鎖破損を修復した配列に長さも構成もよく似ていた。またこれら酵母ゲノム中に見られたミトコンドリア起源の塩基配列の多くは、染色体の非翻訳領域に位置し、その44% (14/32) はレトロトランスポゾンの長い末端反復配列やトランスファーRNAの近傍に存在した。ゲノム中のこれら配列はミトコンドリアの中にある配列と完全またはほぼ完全に一致することから、比較的最近に起こった組み込み現象と考えられる。

M. Ricchettiらが今回行った実験や酵母ゲノム解析の結果は、ミトコンドリアから酵母ゲノムへ遺伝子情報が現在においても流れ込みつづけていることを示唆するもの、といえるかもしれない。

（抄訳：家藤治幸 - 国税庁醸造研究所）

◀文献情報▶

根粒の発達をコントロールする植物のレギュレーター

A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules

Leif Schauser, Andreas Roussis, Jiri Stiller and Jens Stougaard

Nature, 402: 191-195 (1999)

マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定は、よく知られた現象である。しかし、根粒菌の感染から窒素固定活性の発現に至るまでの分子機構については、未だ不明な点が多い。最近、マメ科のモデル植物としてミヤコグサ (*Lotus japonicus*) が注目されているが、本論文はミヤコグサの *Ac* タグラインから根粒が着生しない変異体を見だし、その原因遺伝子を明らかにした報告である。

nin (nodule inception) と名付けられたこの変異体は、ミヤコグサ根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) を接種しても根粒を形成しない。その他の形態的異常は認められず、*nin* 遺伝子の変異は通常の成育には影響を及ぼさないと考えられる。根粒菌が生産する Nod 因子がシグナル分子として宿主植物に作用すると、根粒形成に関する植物側の遺伝子発現プログラムのスイッチが入る。最初に観察される変化は、カーリングあるいは Shepherd's crook と表現される根毛の形態変化及びそれと相前後して起こる根粒原基の形成である。根粒菌は、形態変化を生じた根毛の先端から感染糸を經由して宿主植物の細胞内へと侵入する。根の組織は脱分化し、再び細胞分裂を開始して根粒組織が形成された後初めて宿主細胞内で根粒菌の窒素固定活性が発現する。*nin* 変異体の根毛は、*M. loti* の接種により特徴的な形態変化を示したが、感染糸及び根粒原基の形成は観察されなかった。このことから、*nin* 変異体は Nod 因子に応答はするものの、その後の感染糸及び根粒原基形成に至るシグナル伝達に異常があると考えられる。*Ac* のタグを頼りに、cDNA ライブラリーから *nin* の cDNA クローンを単離した。RNase protection assay を行う

と、根以外の組織でも *nin* 遺伝子の発現が検出されたが、特に根では、根粒菌の感染にตอบสนองして発現量が上昇した。また、*in situ* hybridization では、根粒原基、発達した根粒の柔組織、根粒中央部の共生領域、維管束、根の中心柱での *nin* 遺伝子の発現が検出された。

cDNA から予想される NIN タンパク質は、DNA 結合領域など、転写調節因子として機能する幾つかの構造上の特徴を有していた。また、クラミドモナスのメイティングタイプの決定に関係する Mid タンパク質とも共通なアミノ酸配列が存在していた。根粒形成とクラミドモナスの配偶子形成が、どちらも窒素制限下でコントロールされていることを考え合わせると興味深い。NIN タンパク質の機能が明らかになったわけではないが、著者らは、根粒菌の感染シグナルにตอบสนองして膜に結合している NIN タンパク質が酵素的に切断され、C 末端側の部分が核へ移行し転写調節因子として機能することにより、感染糸や根粒原基形成に関与する宿主植物遺伝子の迅速な発現を引き起こしているのではないかと考察している。(抄訳：内海俊樹 鹿児島大理学部)

◀文献情報▶

重篤なインスリン抵抗性,糖尿病および高血圧に関連するヒト PPAR γ の遺伝子突然変異

Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension

I.Barroso, M. Gurnell, V.E.F. Crowley, M. Agostini, J.W. Schwabe, M.A. Soos, G. LI Maslen, T. D. M. Williams, H.Lewis, A. J. Schafer, A. K. K. Chatterjee and O'Rahilly

Nature, 402, 880-883 (1999)

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) は、1980年代後半にリガンド未同定の核内受容体としてクローニングされた。1995年に、*in vitro*で脂肪酸をリガンドとし、脂肪組織における脂肪産生の調節に関与することが明らかとなり、さらに、抗糖尿病薬チアゾリジンジオン類がこの受容体と結合して作動することが判明したため、脂肪産生、グルコース恒常性の維持に関与する重要な因子として脚光を浴びるようになった。チアゾリジンジオン類は、「インスリン非依存性」であるII型糖尿病患者のインスリン感受性を改善し、血漿中のグルコース濃度の減少、血圧の低下作用を持つことから、PPAR γ に関する研究はインスリン抵抗性の分子基盤の焦点となっている。しかし、PPAR γ のグルコース恒常性制御への関与を思わせる報告はあるものの、原因遺伝子の同定が困難等の理由から、両者の関係の直接的な証明はなされていなかった。本論文では、世界で初めてPPAR γ 遺伝子の機能喪失変異が同定されたことについて報告している。II型糖尿病患者85人のPPAR γ 遺伝子を解析したところ、3人に新たな遺伝子の変異が観察された。これらの変異した遺伝子ではヘテロ接合でみられるPPAR γ リガンド結合ドメインに2種の変異が起こっており、患者は重篤なインスリン抵抗性を示し、異常に若年でII型糖尿病と高血圧を発症した。これらの変異受容体を株化細胞に発現させて、*in vitro*の実験系で調査したところ、転写活性

が著しく低いだけでなく、正常なPPAR γ を同時に発現させても変異体の形質が優性に現れ、正常な活性が阻害されることが確認された。さらに、変異受容体の結晶構造解析を行ったところ、トランス活性化に関わる部位が不安定な構造に変化しており、*in vitro*の実験結果が裏付けられた。これらの結果は、ヒトにおいて、PPAR γ がインスリン感受性、グルコース恒常性、血圧の制御に重要な役割を果たしていることを直接証明した初めての報告である。

さて、前述したとおり、PPAR γ は脂肪酸をリガンドとするのだが、n-3系多価不飽和脂肪酸に富む魚油は、特に作用が強いことが報告がされている。この報告を裏付けるように、魚を常食するイヌイット達は、人口に占める肥満の割合が低いという臨床報告があり、肥満/糖尿病モデルラットを用いた研究でも、魚油を摂取させた場合、脂肪前駆細胞から熱産生を行う褐色脂肪組織への分化誘導が高まることが報告されている。これらの結果から、熱産生が盛んになることで、血中の糖質、脂質が効率的に使われ、血中クリアランスが高まることが考えられる。この脂肪前駆細胞から褐色脂肪組織への分化誘導はPPAR γ 経由で行われるのではないかという意見もあり、今後の研究により、魚油の持つ優れた生理作用のメカニズムがまた一つ明らかとなることが期待される。

(抄訳: 室田一貴 マルハ(株)中央研究所)

◀海外便り▶

カイコにおけるレトロウイルスベクターの利用 —フランス・分子細胞遺伝学センターでの1年間—

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所
河本 夏雄

はじめに

フランスのリヨン市は絹織物を基盤として発展し、現在ではマルセイユと並んでパリにつぐ大都市になっている。絹織物産業を支えた養蚕業はフランスではほとんど絶えてしまったが、カイコの繭をかたどった菓子がリヨンの名物となっているなど、かつての名残りを多く見ることができる。このリヨン市にある分子細胞遺伝学センター(CGMC)で1998年2月からちょうど1年間、科学技術庁長期在外研究員として表題の研究を行なう機会を得た。CGMCは国立科学研究センター(CNRS)の傘下にある研究所で、クロードベルナルリヨン第1大学のキャンパスにある。トランスジェニックカイコ作出法について日本での私の所属研究室と共同研究を行なっていた縁で、CGMCのP.クーブル博士の研究室に滞在して研究を行なった。

カイコにおける レトロウイルスベクターの利用

カイコは、長年の研究の結果、多様な突然変異の解析などの基礎的知見が蓄積され飼育法も確立されているなど、モデル生物としてキイロショウジョウバエに続く昆虫種になる可能性を秘めている。しかし、外部から遺伝子を導入する技術が欠けているために、カイコを用いた研究は様々な点で制約を受けてきた。

私がフランスに渡った当時、カイコ個体に

KÔMOTO Natuo

〒305-8634 茨城県つくば市大わし1-2

遺伝子導入をする実験系は確立されておらず、複数の研究グループが様々なベクターを試している段階だった。用いられていたベクターを分類するとトランスポゾン・バキュロウイルス・レトロウイルスの3種類があり、クーブル研究室ではトランスポゾンとレトロウイルスを平行して扱っていた。各地の研究者はトランスポゾンに集中していたため、多様な可能性を試す目的で1年間のテーマとして私はレトロウイルスベクターを選んだ。ところが、フランスに到着してしばらくすると、バキュロウイルスベクターを用いてカイコ個体に遺伝子を導入したという論文が発表され、さらに帰国間近には、日本での私の所属研究室でトランスポゾンベクターを使って遺伝子導入に成功したというニュースが伝わってきた。結論からいえば、レトロウイルスベクターを使ってトランスジェニックカイコをつくることは今回の滞在中にはできなかった。しかし、1年という限られた時間の中で一定の成果をあげることはできたので、以下にその研究について経過をまじえて報告したい。

実験に用いたのはMoloneyマウス白血病ウイルス由来の非病原性レトロウイルスベクターで、RNAゲノムを持っている。またenvタンパク質として水泡性口内炎ウイルス(vesicular stomatitis virus)のタンパク質(VSV-G)を用いている。VSV-Gは細胞膜中のある種のリン脂質を認識するため、このVSV-Gで覆われたウイルス粒子は宿主特異性が広く様々な生物種に侵入することができる。

ウイルスベクターを産生する過程を図1に示す。ウイルス粒子産生に必要な遺伝子のうちenv以外はウイルス産生用の培養細胞に取

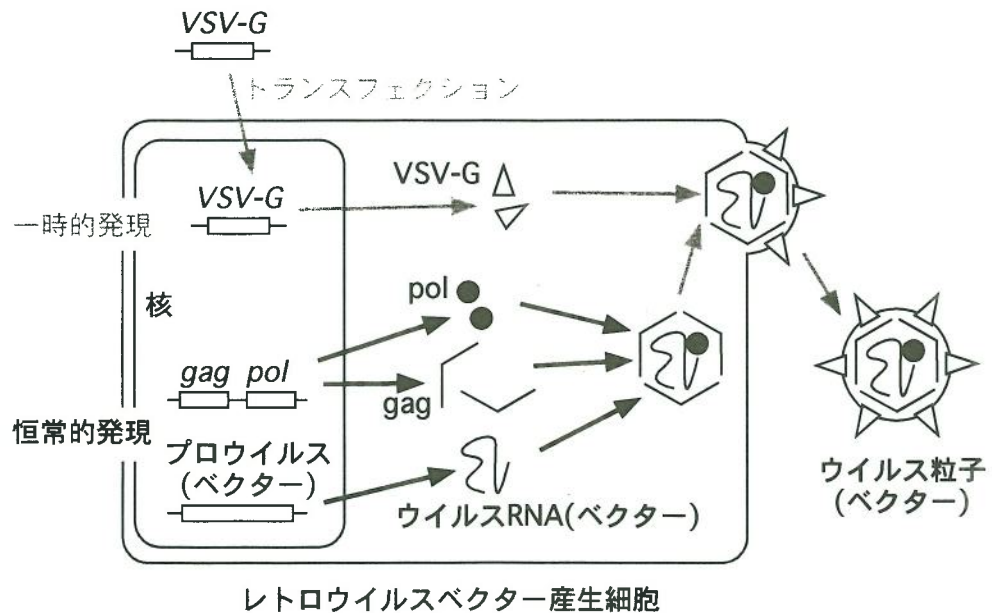


図1 レトロウイルスベクター産生細胞

り込ませてある。このような細胞は細胞内では恒常的にウイルス粒子をつくっているが、*env* 遺伝子を欠くために細胞外にウイルスを放出することはない。ここで、トランスフェクションによって *VSV-G* 遺伝子を一時的に細胞内に導入すると、完成されたウイルス粒子が細胞外に放出される。これを集めて遠心分離機で濃縮するまでがベクターの準備となる。

まず初めに、研究室に用意されていた細胞を使ってウイルス粒子を準備し、さっそくカイコ卵に注射してみた。このウイルスベクターには選択マーカーとして緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子が組み込んであり、細胞の染色体中にベクターが取り込まれればその細胞が緑色の蛍光を発する仕組みになっている。しかし、注射をした卵から孵化した中には蛍光を出す個体は見つからなかった。それでも、ベクターが挿入されてもその中の遺伝子の発現が抑制される可能性もあるので、最終齢まで生き残った個体をサザンハイブリダイゼーションで解析してみた。すると、期待とは異なるバンドパターンが得られた。対照として用いたウイルス産生細胞の DNA でも同様のバンドが検出されたことから、この細胞の中のベクター配列そのものが異常になっていることが明らかになった。そこで、この細胞をつくったアメリカの共同研究者に問い合わせた元々のストックを確認してもらったと

ころ、やはり異常が見つかった。結局、彼らが細胞株を樹立した段階で染色体中のベクターの構造を確認していなかったことが問題の根源だった。この事実が判明した時点ですでに研究開始から半年が経過しており、1年限りの研究としては大きな痛手だった。

しかし、少なくとも胚の体細胞にはウイルスが侵入してゲノムRNAが逆転写されていることは確実だった。また、強いシグナルがサザンハイブリダイゼーションで検出できたことから、カイコ体細胞の染色体にベクターが挿入されている可能性も高いと判断し、構造が確認されている別のベクターを手に入れて実験を再開した。

時間がなくなったため、トランスジェニックカイコをつくるための経代飼育をする時間もなく、体細胞への取込みを最終齢幼虫で確認するという計画を立てた。前述のようにちょうどこのころトランスポゾンで成功したというニュースが日本から伝わってフランス側でもトランスポゾンに集中することになり、私が帰国した後の経代飼育をする余裕がなくなったという事情もあった。

さて、再びカイコ卵にウイルス粒子を注射し、孵化した幼虫を検査したがやはり蛍光は見られなかった。しかしこの時のベクターに使ったプロモーターは昆虫での活性が高くないと考えられていたので、蛍光が出ないこと

は予想されたことだった。そこで、実験個体が最終齢になったところでゲノムDNAを抽出しベクターの挿入を確認した。まずPCRによるチェックはすべての個体が陽性だったので、ベクターが効率良く逆転写されていることがわかった。ついでサザンハイブリダイゼーションを行なったところいくつかの個体では予想通りのシグナルが得られた。また、ウイルスベクターがどのような位置に挿入されたかを確認するためにインバースPCR(図2)を行ない1個体でバンドが得られたのでその塩基配列を解読した。すると、カイコのゲノムに多数散在するトランスポゾンBm1がウイルスベクターの末端の近傍に存在していた。つまり、ウイルスベクターがカイコの染色体に取り込まれたことが明らかになった。

レトロウイルスベクターの特徴は、自力で細胞膜を通過することと、染色体に効率良く挿入できることとにある。生殖細胞系列への遺伝子導入手法としては他のベクターに水をあげられているものの、上記の特徴を生かした使い方が期待できる。例えば、特定の組織での遺伝子発現を調べる時など、顕微注入やパーティクルガンなどの特別な技術・装置を使わずに遺伝子を取り込ませることができる。また宿主特異性が広いことも大きな利点だ。今後、プロモーターの改良などを経てこのベクターが広く利用されることを願っている。

フランスでの生活

日本でよく言われるフランス人像に「フランス人は英語を知っていても話さない」というものがある。挨拶程度しかフランス語を知らない私が果たして生活できるのか不安もあった。しかし、それはまったくの杞憂だった。研究室内では当然のように英語で意思疎通できたし、こちらがフランス語を理解しないとわかると町の人々も片言の英語でよく話しかけてくれた。ただ、これには地域性もあ

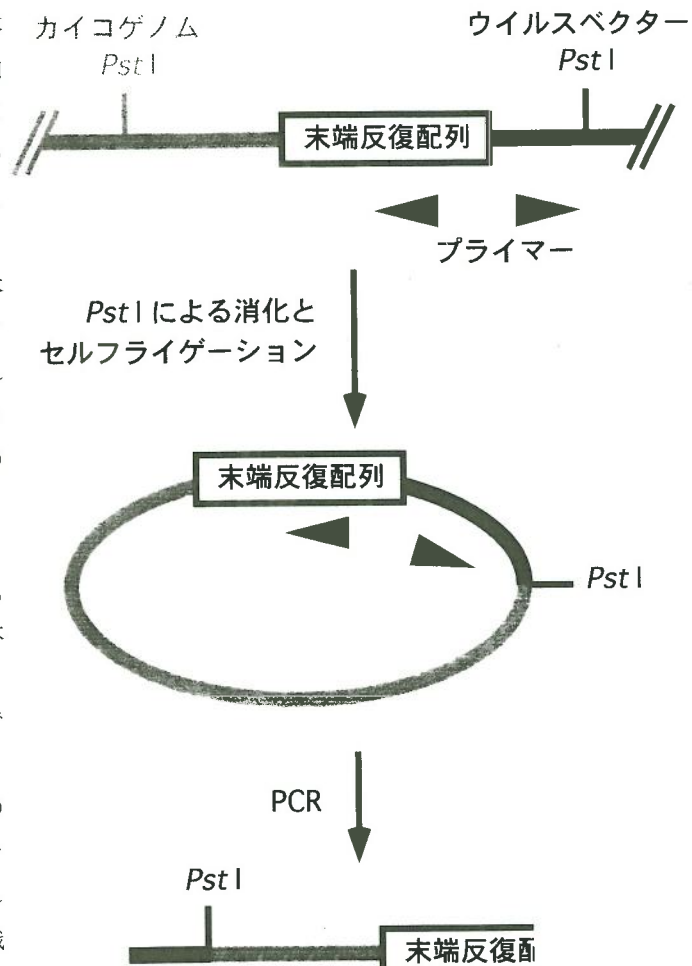


図2 インバースPCR

るだろう。リヨンには日本人が少なく(人口100万人以上の町で日本人は当時400人くらい)日本からの旅行者も少ないので、パリのように日本語だけで生活ができるような都市とは、日本人に対する接し方も異なるようだ。

それでもやはりフランスではフランス語を話せた方が格段に楽しい。私自身も、「ジャガイモを3キロください」と市場で言うことから始めて徐々に慣れていき、ついには、旅行先の観光客相手のレストランで英語のメニューを出されても料理がイメージできずフランス語のメニューを頼むくらいになった。やはりフランスでは食べ物から入るのがよいかもしれない。

BRAIN 国際テクノフォーラム — トウモロコシ育種の最前線 —

BRAIN 国際テクノフォーラム — トウモロコシ育種の最前線 —

主催：生物系特定産業技術研究推進機構(BRAIN)

後援：農林水産省草地試験場、(社)畜産技術協会、
(社)日本飼料作物種子協会

協賛：(社)農林水産先端技術産業振興センター (STAFF)

日時：平成11年11月10日(水)11:00～16:30

場所：虎ノ門パストラル新館4階桜の間 (港区虎ノ門4-1-1)

フォーラム次第：

1. 開会 (11:00)
2. 開会挨拶：堤 英隆 (生物系特定産業技術研究推進機構理事長)
3. 総合司会者挨拶：井上康昭 (農林水産省草地試験場育種部長)
4. 講演演題ならびに演者
 - 1) トウモロコシゲノム研究の現状—ミズーリ・メイブ・プロジェクト
マイケル D. マクマレン (米国農務省植物遺伝学研究所)
 - 2) トウモロコシ雄性不稔性回復制御のための遺伝子工学
マーク C. アルバートセン (パイオニア・ハイブリット・インターナショナル社)
 - 3) サイレージ用トウモロコシの耐倒伏性および消化性育種における
最近の成果、とくに日本在来フリント種の利用について
池谷 文夫 (農林水産省九州農業試験場畑地利用部)
 - 4) ポスト・ゲノム・ゲノム時代への課題：トウモロコシの雄性不稔
回復に必要な RF2 タンパク質の基質の同定
パトリック S. シュネーブル (米国アイオワ州立大学)
5. 閉会挨拶：岡村 隆夫 (生物系特定産業技術研究推進機構理事)
6. 閉会 (16:30)

とが紹介された。

続いて、総合司会を担当する草地試験場の井上康昭育種部長から今回のフォーラムのテーマについて、日本におけるトウモロコシの作物としての位置づけ、また、海外におけるトウモロコシ研究の進展を踏まえ、トウモロコシ育種研究の動向を探ることが非常に重要である旨を紹介した後、各講師の講演に移りました。

1) ミズーリ・メイブ・プロジェクト

最初の講師として、米国農務省植物遺伝学研究所のマイケル・マクマレン博士が、「トウモロコシゲノム研究の現状」と題して、ミズーリ・メイブ・プロジェクトにおける研究を紹介していただきました。

これは、米国の国立科学財団の支援を受けたプロジェクトで、トウモロコシのゲノムデータベースの作成を目的とし、トウモロコシゲノムの物理的地図と遺伝子地図を統合した新しい高精度の遺伝地図データベースを作成し、その情報を公開しようというものです。

プロジェクトでは、1)高い効率のマーカーを得るために、SSRを多く含むライブラリーのシーケンシング、公開された配列からより新しいマーカーの探索を実施していること。2)また、より高精度のトウモロコシ遺伝子地図を作成するため、B73及びMo17という代表的な近交系の交配を行い、これらの交配を繰り返すことにより、マーカー配列の順序についての精度を上げていること。3)更に、物理的地図作製のため、近交系B73を材料に、BACライブラリーを作成し、平均断片が135kbで、ゲノムサイズの10倍以上をカバーしていること等の特徴があります。このライブラリーは、RFLP、SSR、およびESTマー

昨年11月10日、虎ノ門パストラルにおいてBRAIN国際テクノフォーラム「トウモロコシ育種の最前線」が開催されたので、その概要をご紹介します。

フォーラムに先立ち、堤 英隆生物系特定産業技術研究推進機構理事長の挨拶があり、今回の企画には農林水産省草地試験場、(社)日本飼料作物種子協会のご協力、また開催に当たり(社)畜産技術協会、(社)農林水産先端技術振興センター、JRA日本中央競馬会、全国競馬畜産振興会より多大の協力を頂いたこ

カーを用いて調べるために高密度フィルター上に配置しています。

このほか、植物用の新しいマッピングの手法として、動物では既に行われているラジエーション・ハイブリッドなどの新しい手法の開発も実施しています。

最後に、ミズーリ大学のメイズ・データベースを紹介。これらデータベースの利用性を高めるために、データの表示方法、データベースで扱うデータ、ソフトウェア開発、用語の統一など、現在の状況を紹介します。締めくくりました。

2) トウモロコシの雄性不稔

2番目に、パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社のPlant Reproductive Biology Groupのリーダーであるマーク・アルバートセン博士に、「トウモロコシ雄性不稔性回復制御の遺伝子工学」というタイトルで講演をいただきました。

前段として、ハイブリッド種子生産を、雄穂の抜き取りだけで行うと、全米のハイブリッド種子生産に要するコストが1億ドルと見込まれることなど、雄性不稔遺伝子の制御の必要性を説明した後、パイオニア社で開発した雄性不稔系統の利用技術について説明いたしました。

パイオニア社では、ホルモン剤などの化学物質を与えることで雄性不稔をコントロールできる2つの技術を開発しています。

1つは、Pionner Constitutive Sterility(PCS)を利用する方法で、先ず変異した雄性稔性遺伝子MS45を利用し、雄性不稔系統を造成し、更に特定の化学物質を与えると発現するよう遺伝子工学により加工した変異していないMS45遺伝子により稔性回復を行います。この方法で、劣性ホモの雄性不稔性系統を自殖により維持できます。また、この系統を利用したハイブリッド種子生産ではどのような花粉親と交配しても稔性を回復できます。

もう一つは、Reversible Dominant Male Sterility(RDMS)と呼ばれるもので、花粉形成時に薬においてアビジン、もしくはストレブ

トアビジンが発現することにより起こる優勢の雄性不稔を利用するものです。バイオチンの添加により、花粉稔性を回復し、花粉、種子の生産を可能とし、自殖系統の維持を行うことが出来ます。

PCSでは、稔性誘導物質で処理するまで雄性不稔であること、また、RDMSでは、近交系維持においてのみ稔性回復の処理を行えばよいことなどが特徴となっています。

これらの体系は両方とも、最新の遺伝子工学を応用したものであり、実用化に向けて研究中と説明いたしました。

3) 日本におけるトウモロコシ育種

続いて、農林水産省九州農業試験場飼料作物育種研究室の池谷文夫室長より「サイレージ用トウモロコシの耐倒伏性および消化性育種における最近の成果、特に日本在来フリント種の利用について」と題し、日本におけるサイレージ用トウモロコシの育種についてご紹介いただきました。

我が国においては、従来、米国から導入したデント種を中心に利用されて来ましたが、これらの品種は、我が国の気候・風土への適応が必ずしも十分でなかったこと、また、日本での利用はサイレージ利用が主体であるのに対し、米国の品種は子実用が主体でした。

近年、日本在来のフリント種の茎葉消化性に顕著な品種・系統間差異があることが判り、この研究ではホールクロップサイレージとしての栄養価に優れ、耐倒伏性が強く、我が国の栽培環境に適した品種の開発を目指して行われてきました。

耐倒伏性では、台風によらず検定できるようにHPR値(引き倒し力評価値: Horizontal Pulling Resistance Value)による選抜法を開発。組み合わせでは、フリント種×デント種の組み合わせにより雑種強勢により耐倒伏性が高まることを明らかにしています。

また、消化性について、茎葉消化性の差異について、細胞内容物(OCC)含量との関係に着目し、ホールクロップの栄養価を高めるため、茎葉消化性と乾雌穂重割合を総合的に

評価しています。

これらの研究成果を活用して、耐倒伏性の強い高消化性品種の開発が進め、最近育成した、在来フリント種に由来するF1親自殖系統を用いて、「ナスホマレ」と「ゆめそだち」の2品種、及び、近々農林登録が予定されている「九交B93号」など有望系統を紹介しました。

4) ポスト・ポスト・ゲノム時代への課題

最後に、アイオワ州立大学のパトリック・シュネーブル博士が「ポスト・ポスト・ゲノム時代への課題：トウモロコシの雄性不稔性回復に必要なRF2タンパク質の基質の同定」と題した講演を行いました。

細胞質雄性不稔は、母株を通じて遺伝するもので、稔性を回復する遺伝子の存在がすでに確認されています。特にT細胞質雄性不稔については、ハイブリッド種子生産に広く活用された一方で、ゴマ葉枯病に感受性のある遺伝子との関連でよく研究されています。このT細胞質雄性不稔遺伝子の回復遺伝子であるrf1及びrf2を例に取り、ポスト・ポストゲノム時代の課題について行ったケーススタディーが紹介されました。

ゲノム解析の次のステップ（ポスト・ゲノム）における課題の一つに、新しく発見されたタンパク質がこれまで分子構造の判っているタンパク質と配列の類似性が見いだせない場合に、どのようにして機能を推定するかということがあります。更に、このタンパクの

機能を推定した後に、そのとおりの機能を発揮しているか、また、代謝経路の中でどのような働きをしているか等の研究をポスト・ポスト・ゲノム時代の課題としています。

T細胞質に関連した雄性不稔性は、ミトコンドリアのキメラ遺伝子T-urf13の働きによるものと考えられており、稔性回復には、2つの回復因子rf1及びrf2の活動が必要とされています。

クローンされたrf2遺伝子をコンピュータ解析した結果から、これはミトコンドリアのアルデヒド脱水素酵素(mtALDH)の塩基配列であることが示唆され、引き続き3つの実験を行って、RF2たんぱく質はミトコンドリアのアルデヒド脱水素酵素(mtALDH)であること確認しています。

ここまで到達した状態、つまり配列が判り、機能が判り、生化学的な性状も判ったにもかかわらず、遺伝子のコードしている酵素が雄性不稔にどのように関わっているかが判らない状態。これをポスト・ポスト・ゲノム時代として定義付け、その後の取り組みについて紹介をいただきました。

最後に、岡村隆夫生物系特定産業技術研究推進機構理事が挨拶を行い、最先端の成果をご紹介いただいた各講師の方々、総合司会の井上康昭部長への謝意を述べ、フォーラムを終了しました。

生研機構からのご案内

21 緊プロ事業により2機種が開発されました

農業機械化促進業務における21世紀型農業機械等緊急開発事業により開発した「米品質測定評価装置」と「軟弱野菜調製機」が、3月1日、本部にて公開されました。詳しくはホームページ (<http://www.brain.go.jp>) をご覧下さい。

基礎的研究開発促進事業(若手研究者支援型)の課題が決まりました

応募のあった191課題の中から次の7課題が採択されました。

研究課題名 (研究代表者氏名及び所属)	研究チーム構成	分野
「遺伝子導入飼料作物を用いた新しい家畜疾病予防法の開発」 松本 安喜 (東京大学大学院農学生命科学研究科)	新川 武 (琉球大学医学部) 辻 尚利 (農林水産省家畜衛試験場)	①
「NMRによる機能未知タンパク質の動的構造解析と機能の推定に関する基礎的研究」 山崎 俊正 (農林水産省農業生物資源研究所)		⑤
「環境化学物質応答の分子機構の解明」 高橋 智 (筑波大学基礎医学系)		①
「穀類細胞への新たな遺伝子導入法の開発」 野々村 賢一 (国立遺伝学研究所)		①
「食品成分による脂質代謝の調節に関する研究」 森山 達哉 (京都大学食糧科学研究所)		②
「進化工学手法によるシロアリセルラーゼの改変と高効率セルロース糖化系の開発」 渡辺 裕文 (農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所)		③
「ミツバチの脳機能に働く遺伝子を利用した新品種開発等に関する基礎的研究」 久保 健雄 (東京大学大学院薬学系研究科)		③

注1：分野欄の○の中の数字は、それぞれ次の研究分野を示す。

- ①：生物機能解明・生産力向上分野 ④：生物機能利用による環境改善分野
 ②：高機能・高品質食品分野 ⑤：共通基盤研究その他生物機能の高度利用のための研究分野
 ③：生物系素材分野

注2：採択課題の並びは研究課題名の五十音順である。

研究開発事業の成果がまとまりました

ガット・ウルグアイ・ラウンド農業合意対策の一環として、平成7年度より11年度まで5年間実施してきました研究開発事業の成果集を作成いたしました。ご希望の方は、企画第1課までご連絡下さい。なお、成果につきましては、ホームページでもご紹介しております。成果の普及に関する業務は4月以降も継続します。

生研機構からのご案内

平成12年度募集について

生研機構で実施しております下記の各種事業につきまして、平成12年4月より募集を開始する予定としておりますので、お知らせいたします。なお、詳細につきましては生研機構のホームページにおきまして、ご紹介させていただく予定といたしておりますのでご覧ください。(TEL:03-3459-6565 URL <http://www.tokyo.brain.go.jp/>)

民間研究促進業務

○出資事業

バイオテクノロジー等の試験研究を行う目的で2つ以上の企業等が新たに設立する研究開発会社に対して出資を行います。

募集期間：平成12年4月3日～4月30日（ご相談は随時受け付けております）

お問い合わせ：出資課 e-mail:shusshi@tokyo.brain.go.jp

○融資事業

企業等におけるバイオテクノロジー等の試験研究について融資を行います。

募集開始時期：平成12年4月上旬（予定：ご相談は随時受け付けております）

お問い合わせ：融資課 e-mail:yushi@tokyo.brain.go.jp

基礎的研究業務

○新技術・新分野創出のための基礎的研究推進事業研究課題の募集

対象とする研究分野：①生物機能解明・生産力向上分野 ②高機能・高品質食品分 ③生物系素材分野

④生物機能利用による環境改善分野 ⑤共通基盤研究その他生物機能の高度利用のための研究分野

応募資格：・大学、国公立試験研究機関、民間の研究機関等、生物系の産業技術に関する基礎研究を実施する能力のある機関に所属する研究者（研究チームの代表者等）であること

・応募する研究内容を適切に実施する能力を有していること

・研究全体に責務を負い、研究に力を注げること

なお、本事業においてすでに採択されている研究課題で研究の実施に責任を持つ研究者並びに他の特殊法人等が政府出資金により実施している基礎研究推進制度において既に採択されている研究課題の研究代表者は応募できません。

また、研究契約は研究機関の代表者との間で締結しますので、応募に当たっては所属する研究機関の代表者の了解を必要とします。

研究期間：原則として3～5年間

研究費の規模：1課題当たり年間1億円程度を上限とし、研究の内容に応じて弾力的に運用します。

採択予定課題数：7～9課題程度

募集期間：平成12年4月3日（月）～5月1日（月）（締切当日必着）

受付時間等 月曜～金曜（祝祭日を除く）午前9時30分～午後5時30分

お問い合わせ：基礎研究課 e-mail:kisoken@tokyo.brain.go.jp

○新事業創出研究開発事業（新規）研究開発課題の募集

ミレニアム・プロジェクトの一環として、農林水産業及び関連産業の競争力の強化を図るため、意欲的な民間企業、国立試験研究機関等も参加する研究共同体を組織し、各民間企業等の技術シーズ、蓄積を生かした研究開発を促進し、新事業創出までの期間の短縮を図ります。

募集期間：平成12年4月（予定）

お問い合わせ：募集開始前に関連情報をホームページ等でご案内いたしますので、ご覧ください。

編集後記

○気温が緩み、すこし春めいてきたこの季節に、ブレイン・テクノニュース第78号をお届けいたします。

○本号の表紙は、国内情報として「トランスポゾンによる植物遺伝子タギング法」の研究を執筆していただいた名古屋大学の町田千代子氏他の方々をお願いして、貴重なシロイヌナズナの写真を掲載させていただきました。ご好意に深く感謝申し上げます。

○本号の総説は、予告の通り、ヒトや動物の健康保持と疾病予防に秘めた働きがあると考えられているサイトカインを取り上げ、農水省家畜衛生試験場の横溝祐一氏に執筆していただきました。これと関連した国内情報として、昆虫ウイルスを用いたサイトカインの生産法を農水省家畜衛生試験場の犬丸茂樹氏に、動物臨床への応用を東京農工大学の板倉敦子氏並びに松田浩珍氏に、さらに農水省野菜・茶業試験場の山本万里氏と北九州工業高専の川原浩治氏の協同研究による抗アレルギー評価のためのヒト免疫担当細胞株の樹立について

を紹介していただきました。

○地域の研究情報としては、静岡大学の丹羽康夫氏にチャ（茶）の遺伝子組換えを目標にした緑色自家発光のクラゲ・タンパク質をマーカー遺伝子に利用した研究を紹介していただきました。海外だよりは、農水省蚕糸・昆虫農業技術研究所の河本夏雄氏にフランスの分子細胞遺伝学センター（リヨン市）での在外研究の経験を記していただきました。

○文献情報は、東北大の木村直子氏、国税庁醸造研究所の家藤治幸氏、鹿児島大の内海俊樹氏、マルハ(株)中央研究所の室田一貴氏の4氏にお願いしました。

いずれも、お忙しいなかを寄稿していただき、ここに厚く御礼申し上げます。

○東京地方は今月末が桜の開花期と予想されています。この頃はまた、各地で多くの研究分野の学会発表が行われます。それらの成果を本誌にも反映できるよう、各位のご協力をお願い致します。 (畠山記)

本誌著作物の複写等について

本誌掲載の論文・記事の複写・転載を希望される方は、執筆者ならびに生研機構の許諾を得て行ってください。

ブレインテクノニュース (第78号)

平成12年3月15日発行

編集兼発行者 堤 英 隆

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

e-mail kikaku@tokyo.brain.go.jp

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 2000