

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

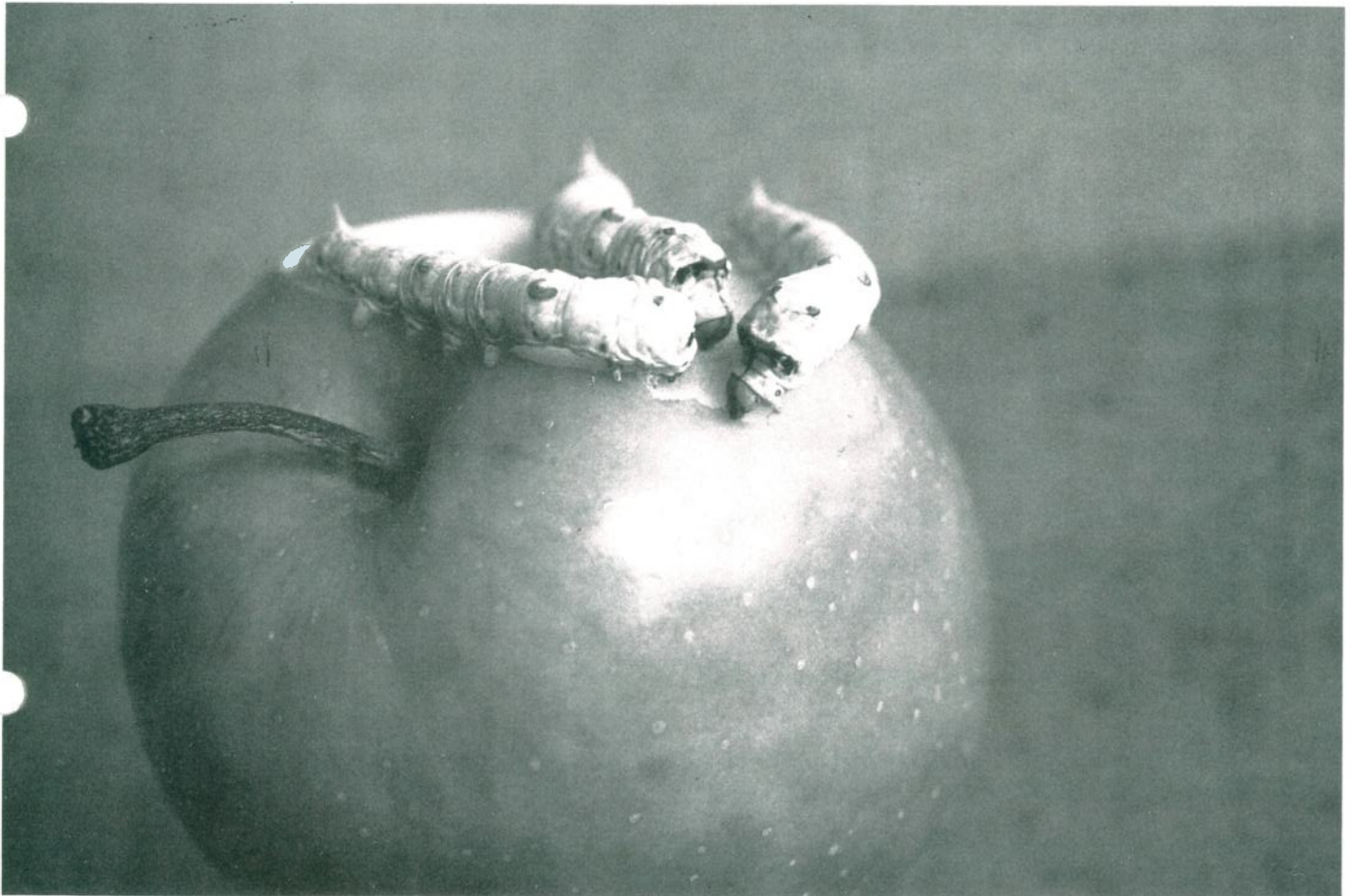
## TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

### ブレインテクノニュース

# 第 25 号

MAY 15, 1991



#### 表紙説明

リンゴを食べている広食性のカイコ

広食性の遺伝子をもつカイコは、普通のカイコと異なり、桑以外の植物などを摂食し、桑粉末の入らない人工飼料でもよく育つ。

(写真提供 井上 元氏)

#### 本号の紙面

国内情報	1
ヒトゲノム解析のためのショットガンPCR法、豚オーエスキー病ワクチン、新しい細胞分裂促進酵素、形質転換カンキツ、成虫原基細胞の培養株	
文献情報	15
眠り病原虫の遺伝子組換え、sICAM-1を用いたライノウイルス感染阻害、染色体導入による大腸癌細胞の腫瘍原性抑制、ミトコンドリア局在性タンパクと病原菌毒素感受性	
海外便り	20
ロングアシュトン試験場(英国)	
国際学会レポート	22
環境汚染と農業に関する国際シンポジウム	
特別情報	25
制限酵素	

## 口 絵

### 国内情報

清水信義

ショットガンPCR法：ヒトゲノム解析のための新技術…………… 1

津田知幸・村上洋介

豚オーエスキー病サブユニットワクチンの開発…………… 3

西田栄介

新しい細胞分裂促進酵素——MAPキナーゼの発見…………… 6

日高哲志

シャトルカルスシステムによる形質転換カンキツの作出…………… 8

三宅 端

キイロショウジョウバエ成虫原基細胞の*in vitro*培養，株の樹立，解析…………… 11

### 文献情報

相同組換えを用いた眠り病原虫(トリパノゾーマ・ブルセイ)の遺伝子組換え体の作出…………… 15

可溶性ウイルス受容体，sICAM-1を用いたライノウイルスの感染阻害…………… 16

第5または第18正常染色体の導入による，ヒト大腸癌細胞の腫瘍原性の抑制…………… 17

ミトコンドリア局在性13kDaタンパク質と病原菌毒素感受性…………… 18

### 海外便り

石井英夫

ロングアシュトン試験場(英国)…………… 20

### 国際学会レポート

袴田共之

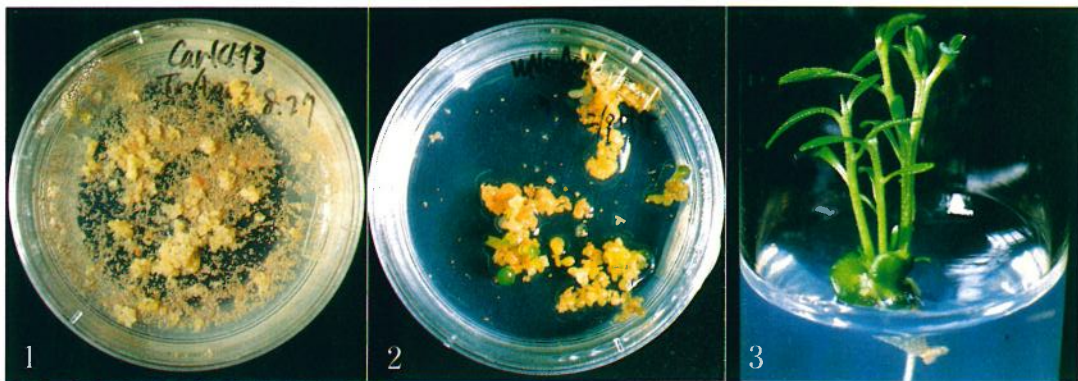
「環境汚染と農業に関する国際シンポジウム」に参加して…………… 22

### 特別情報

小谷博一

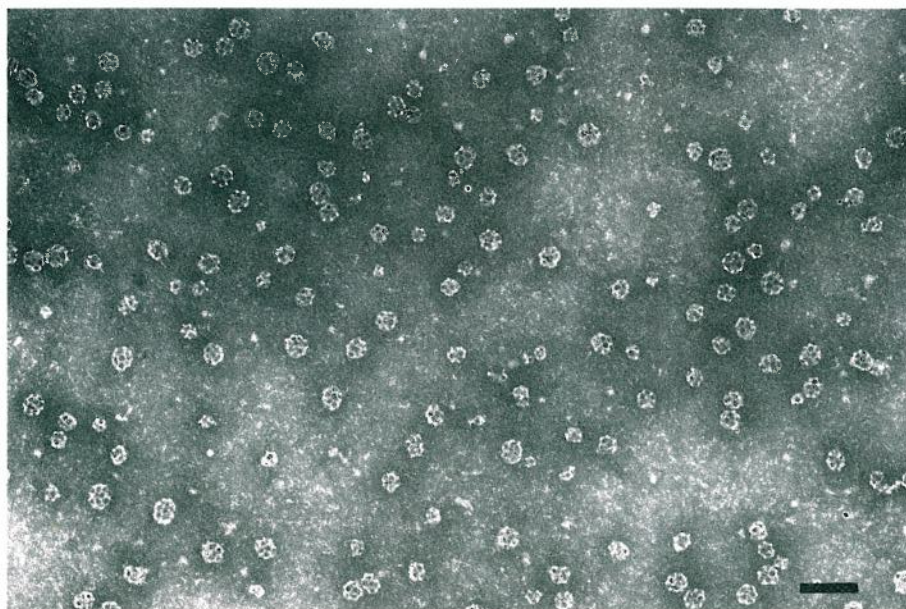
制限酵素について…………… 25

シャトルカルスシステムによる形質転換カンキツの作出 (本文 8 ページ)



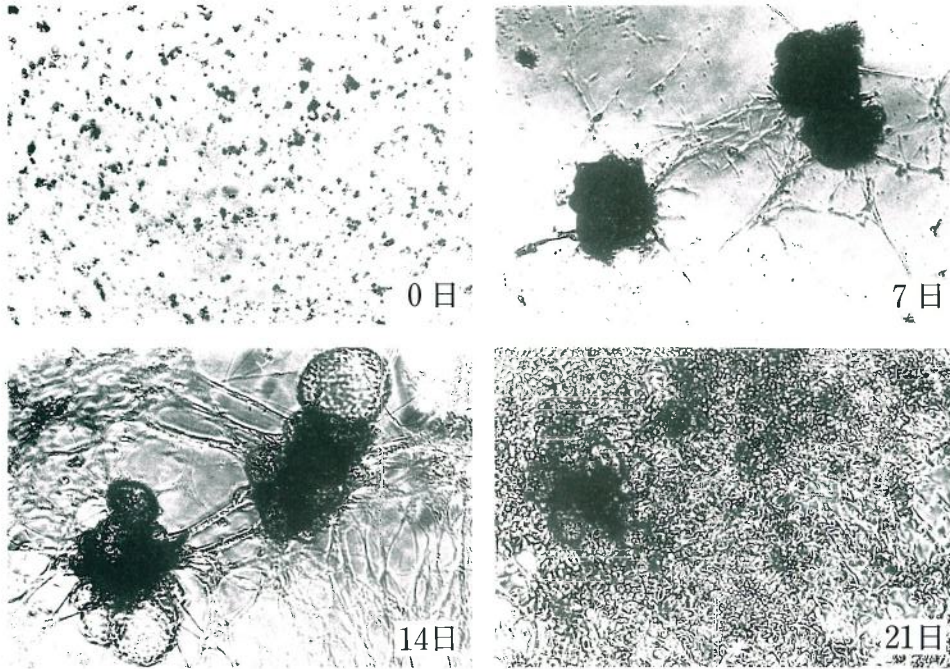
1. 第1次選抜培地上に現われたカナマイシン耐性の「トロピタ」オレンジ花粉起源胚様体カルス
2. 胚様体形成用の第2選抜培地上で分化・成長するカナマイシン耐性の「ワシントンネーブル」オレンジ胚様体
3. ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ「ワシントンネーブル」オレンジ
4. カナマイシンあるいはハイグロマイシン耐性遺伝子を持つカンキツ幼植物

豚オーエスキー病サブユニットワクチンの開発 (本文 3 ページ)

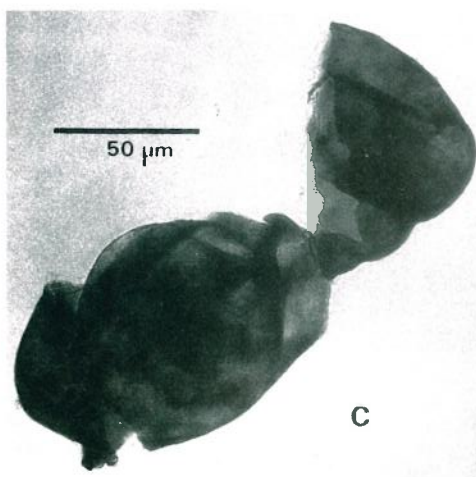
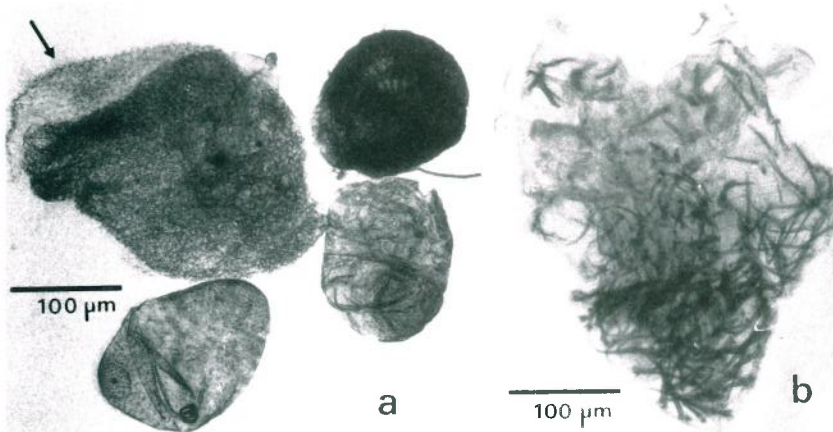


豚オーエスキー病ウイルスの糖タンパクから作った免疫刺戟複合体 (Immunostimulating Complex ; ISCOM) の電顕写真 (スケールは100nm)

キイロショウジョウバエ成虫原基細胞の*in vitro* 培養,  
株の樹立, 解析 (本文 11 ページ)



1. 成虫原基細胞の*in vitro* 培養の様相 (宇井久美子博士撮影)  
各種成虫原基の混合, 培地; CM+10 $\mu$ g/ml イシュリン



2. *in vitro* で培養された成虫原基細胞  
が幼虫腹腔内で作った構造  
(宇井久美子博士撮影)

- a: 細毛構造 (矢印)
- b: 剛毛構造
- c: 単純なクチクラ囊

国内情報

# ショットガンPCR法 ヒトゲノム解析のための新技術

慶応大学医学部分子生物学

清水信義

ヒト体細胞の核には22対の常染色体（第1～22）と1対の性染色体（XXまたはXY）が含まれ、これら染色体DNAが全体としてゲノムを構成しており、そのDNA量はハプロイドゲノム当たり30億塩基対にも及んでいる。このようなヒト染色体DNAには5万種類以上の遺伝子が並んでいる。ゲノムDNAの90

%近くはタンパク質をコードする情報をもたないが、イントロン、スペーサー、反復配列、テロメア、セントロメアの配列など染色体構築において重要な役割を果たしている。

ヒトゲノム解析では全遺伝子のマッピング、クローニング、シーケンシングを目指しているが、その解析の過程で染色体を構築するさ

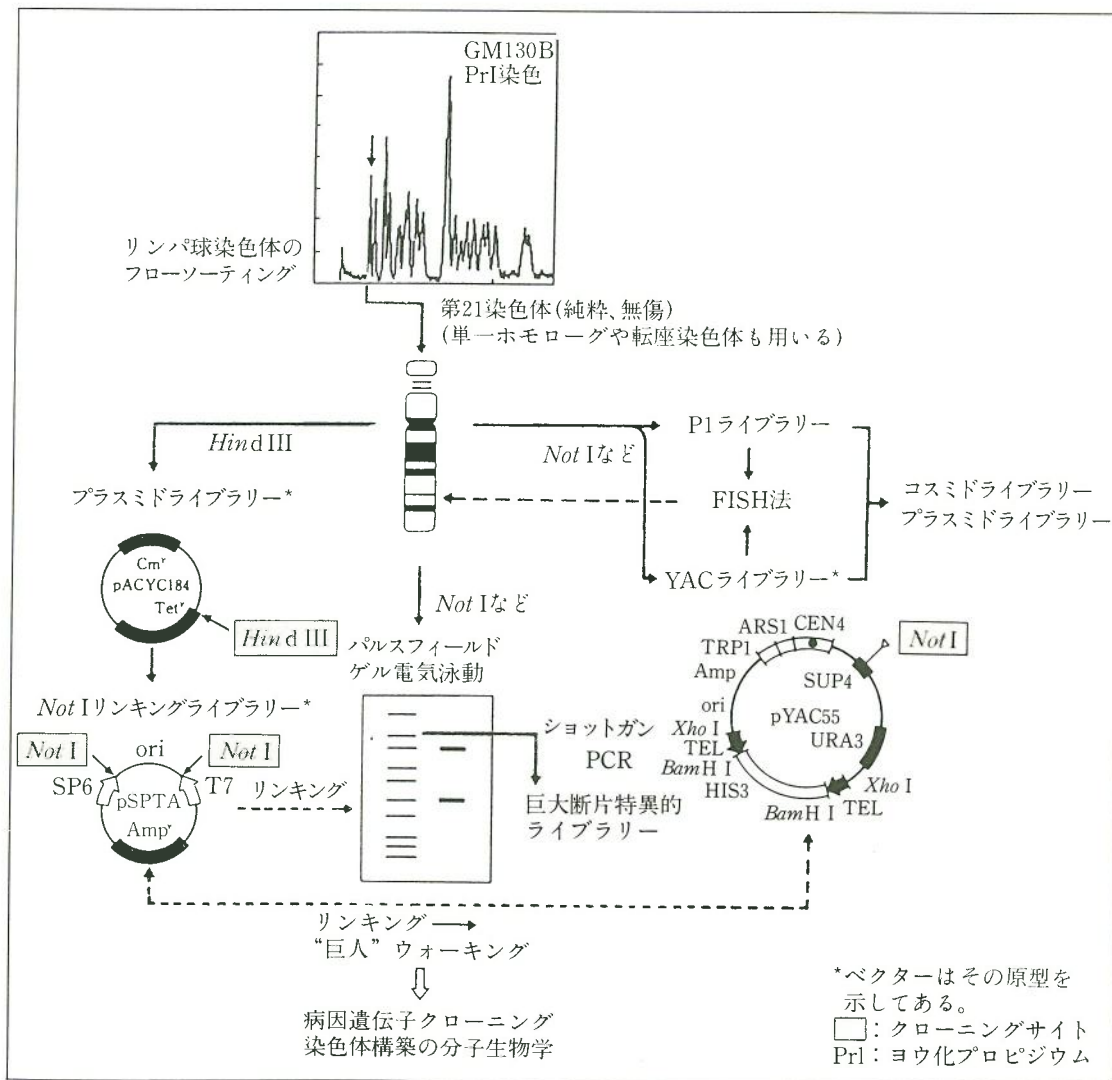


図1 Keio ストラテジーによる染色体のフィジカルマッピングとゲノム生物学への発展<sup>1)</sup>

さまざまなドメインの構造や機能が解明されると期待される。我々はすでに独自の戦略：Keio ストラテジー（図1）<sup>1)</sup>を提唱してヒトゲノム研究を進めているが、その推進にはさまざまな技術の改良・開発が必要である。この中で川崎和彦君（現日立中央研）が中心になって開発したショットガンPCR法<sup>2)</sup>を紹介する。この方法を使えば染色体の特定領域を1Mb位の範囲でカバーするクローンライブラリーを効率よく作成できる。染色体の目指した領域に密集する小断片クローンが多数得られればその領域に推定されている病因遺伝子などのクローニングを著しく容易にする。

我々は染色体ソーティングの技術にさまざまな工夫と改良を加え、最近ヒト第21染色体および第22染色体を高純度で無傷、無菌的に分別することに世界で初めて成功した<sup>3)</sup>。こ

れらの染色体標品をアガロースゲルブロックに包埋した状態でDNAを制限酵素 *Not*I で切断後、パルスフィールドゲル電気泳動で分離し、サザン・ブロッティングを行なうと、*Not*I DNA断片の同定と分離を行うことができる。例えば、第22染色体上の免疫グロブリン遺伝子 IGLC のプローブを用いればそれを含む *Not*I 断片は1.4Mbの巨大断片であることが判る。実際にはそのサイズのDNAが泳動される範囲（1～2Mb）でゲルを1.5ミリ間隔に切り出し、融解した後それぞれにPCRを行って目的の IGLC を含む1.4Mb画分を見いだす。次にこのDNA画分を使って小断片DNAライブラリーを作成するのであるがそのためにランダムPCRを行う（図2）。すなわち1.4Mb DNAをさらに *Nsp*(7524) で切断し、できた断片に合成オリゴプライマーをライゲーションで付加する。このプライマーをもとにPCRを行うと *Nsp*(7524) 断片が増幅される。これをプラスミドにクローニングしてライブラリーを作る。こうして得られたプラスミドクローンの一つ一つについて、実際に第22染色体由来であることをスポットプロットハイブリダイゼーション<sup>3), 4)</sup>で確認する。約60%が第22染色体に特異的であり残り40%は反復配列を含む断片であった。これらのクローンを用いて別に用意したファージライブラリーからより大きなDNAクローンを得ることは容易であり実際そうして得たクローンはFISH法<sup>5)</sup>によるマッピングで第22染色体の特定バンドにマップできる。

このように新しく開発したショットガンPCRによれば、染色体上の巨大DNA断片中に密に分布している多くのDNAマーカーを分離できる。したがって、巨大DNAに相当する染色体領域のより詳細なフィジカルマップの作成ができ、その領域内の病因遺伝子のクローニングを効率よく進めることができる。われわれはこのようなライブラリーを用いて第22染色体に見いだされる特徴的な転座 *t*(11;22)のブレイクポイントのクローニングとともにその近傍に推定されているEwing肉腫遺伝子の追求を始めている。

ヒトゲノム解析はマッピングに始まりシー

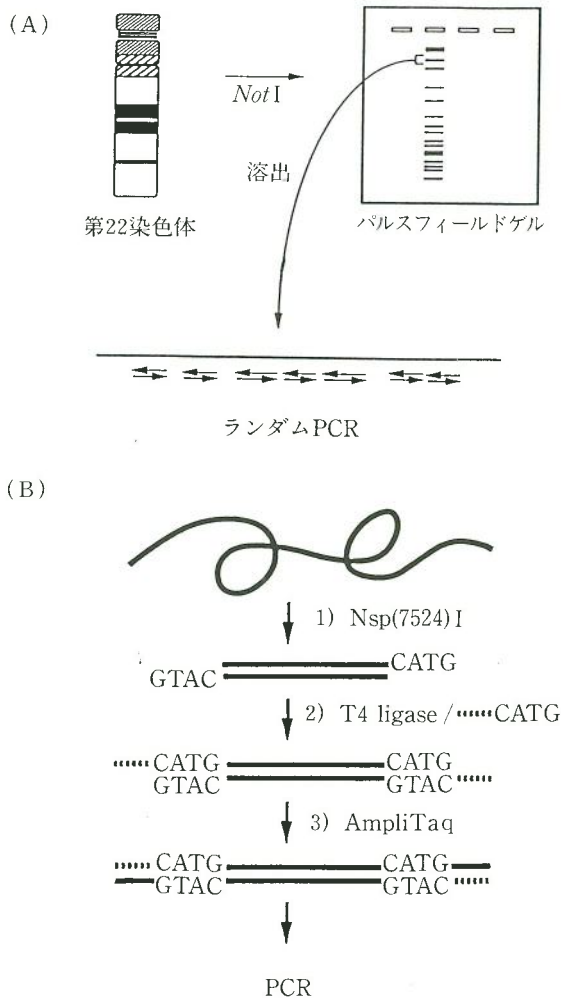


図2 ショットガンPCR(A)とランダムPCR(B)

ケンシングで終わるという一義的な作業ではなく、さまざまな技術の開発が必須でありそれは新しいゲノム生物学や遺伝子医学の誕生のための基盤となり、近い将来生命科学を飛躍的に発展させるであろう。

## 文 献

1) 清水信義 (1990) ヒトゲノム解析の現状と戦略, 代謝臨時増刊号 27: 369-376

- 2) 川崎和彦 他 (1990) ショットガン PCR: 染色体全域に分布する DNA マーカーの効率的分離法, 第2回公開ワークショップ, 「ヒト・ゲノム研究の現状と展望」 東京, Abst. p. 94
- 3) Minoshima, S. et al. (1990) Isolation of giant fragments from flow-sorted human chromosomes, *Cytometry*, 11: 539-546
- 4) 清水信義 (1990) ヒト染色体のソーティング, プレインテクノニュース 19: 11-13
- 5) Fukuyama, R. and N. Shimizu; Submitted

### 国内情報

## 豚オーエスキー病サブユニットワクチンの開発

農林水産省 家畜衛生試験場 診断研究室

津田知幸・村上洋介

### 1. はじめに

豚オーエスキー病はヘルペスウイルスによって起こる急性伝染病で、子豚や若齢肥育豚に死亡あるいは発育停滞を起こすとともに、繁殖豚では、流産、死産、不受胎あるいは造精機能障害といった繁殖障害を起こすために、わが国をはじめ世界各国の養豚業に大きな経済的被害を与えている。本ウイルスはすべての生産段階の豚に感染するが、通常の成豚は感染しても発病することなく潜伏感染を起こし、これがウイルスのキャリアーとなって新たな感染源となるため本病が潜在的に蔓延する原因になる。本病の防除対策は感染耐過豚の摘発・淘汰法が最も確実で有効であり、いくつかの国では清浄化をほぼ達成している。しかし、汚染地域が広範囲に拡大した国では、すべての感染豚を摘発・淘汰することはきわめて困難であるため、ワクチンの使用が検討あるいは実施されている<sup>1)</sup>。

本病のみならず、ヘルペスウイルス感染症はその感染様式あるいは免疫機構の複雑さから、ワクチンに完全な感染防御効果を期待することは困難である。そこで本病に対するワ

クチンには、感染豚の移動によるウイルスの蔓延を防ぐ目的で、血清学的検査によって自然感染豚とワクチン接種豚を識別できることが必要とされる。これまでに実用化されたワクチンの多くは、病原性との関連が示唆されている遺伝子を欠損させて弱毒化した生ワクチンである。さらに、ウイルスの糖タンパクの一部を欠失させ、その糖タンパクに対する抗体の有無によって自然感染豚とワクチン接種豚を識別することをめざしている<sup>2)</sup>。一方、若齢豚や繁殖豚に対しては感染性のない安全な不活化ワクチンが望まれており、中でもウイルス構成成分の中から感染防御に重要な特定の成分のみを含むサブユニットワクチンの開発が強く要請されている。

オーエスキー病ウイルスの感染防御に関与する抗原には、いくつかのウイルス糖タンパクが重要とされている<sup>1, 2)</sup>。しかし、これらの糖タンパクを本来の免疫構造を崩さず効率良く単離精製することは著しく困難である。また、このようなウイルスコンポーネントをサブユニットワクチンとして用いる場合には、活性の高い免疫賦活剤を併用する必要がある。1984年、Morein らは、ウイルスの糖タンパクにグリコシドとの相互作用により抗原提示

構造をとらせることによって免疫効果を高める効果のあることを報告し、これを免疫刺激複合体 Immunostimulating complex (ISCOM) と称した<sup>5)</sup>。両親媒性を持つ糖タンパクはそれ自身の極性によって複合体に組み込まれることから<sup>6)</sup>、ウイルス抗原のサブユニット化もはかれると考えられる。そこで、我々はオーエスキー病ウイルスを用いて ISCOM を作製し、そのサブユニットワクチンとしての可能性を検討した<sup>7)</sup>。

## 2. ISCOM の作製とその性状

ISCOM とは、グリコシドである精製サポニンの Quil A、コレステロールおよびリン脂質が形成する立体構造体に、親水性と疎水性の両方の極性をもつ糖タンパクを疎水性相互作用によって結合させ、複合体としたものである。ウイルス、細菌あるいは原虫などの感染防御に関与する糖タンパクを組み込んだ ISCOM が、宿主の強い免疫を誘導することから、新しいタイプのサブユニットワクチンとして期待されている<sup>8)</sup>。ISCOM は、ウイルスを界面活性剤で可溶化し、その可溶化抗原をグリコシドと接触させ界面活性剤を除去することによって作ることができる。今回、我々は遠心法による ISCOM 作製を行った。

オーエスキー病ウイルス (山形 S-81 株) を BHK 細胞で増殖させ、その培養上清から蔗糖密度勾配遠心によってウイルスを精製した。この精製ウイルスを TritonX-100 で可溶化した後、グリコシド (精製サポニン, Quil A) を含む不連続蔗糖密度勾配遠心による ISCOM を作製した。得られた ISCOM は特徴的な蜂巢状構造を持つ直径約 40nm の均一な粒子であった (口絵)。ISCOM の性状を SDS-PAGE とウェスタンブロットによって調べた (図 1)。SDS-PAGE ゲルの銀染色の結果、精製ウイルスでは多数のバンドがみられたが、ISCOM ではごく僅かであり、ウイルスに含まれるタンパク質の精製が進んでいることがうかがわれた。またウェスタンブロット後の感染耐過豚血清による免疫染色によって ISCOM がウイルス糖タンパク 8 II のみを含むことが確認

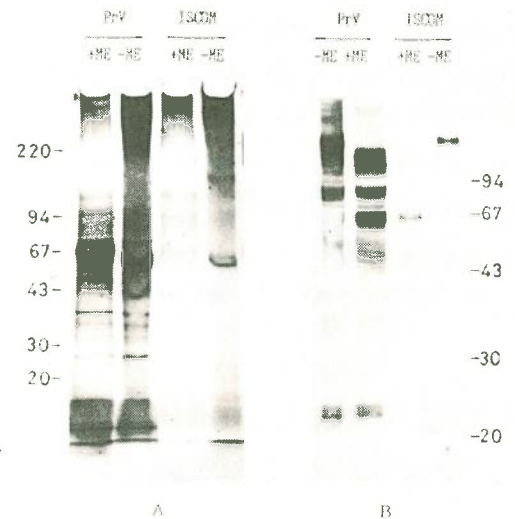


図 1 SDS-PAGE(A)とウェスタンブロット(B)による ISCOM の性状分析

精製ウイルス (PrV) と ISCOM を 2-メルカプトエタノールの存在 (+ME) および非存在 (-ME) 下で処理した。数字は分子量マーカー ( $\times 10^3$ )

された。ISCOM はその免疫原性の高さからサブユニットワクチンの候補とされているものであるが、こうした結果は ISCOM の作製の過程でウイルス糖タンパク精製が可能であることを示している。

## 3. 子豚での発症防止効果

豚のオーエスキー病ワクチンには、①感染防御効果あるいは発病防止効果、②ウイルスが感染した場合のウイルス排泄量を抑える効果、そして、③自然感染豚とワクチン接種豚を血清学的検査により識別できるマーカーを持つことが要求されている。そこでこれらの各点について ISCOM のワクチンとしての効果を検討した。1 か月齢の豚に ISCOM を 2 週間隔で免疫し、最終免疫後 10 日目にウイルスの攻撃を行って臨床症状の観察、鼻汁からのウイルス排泄および抗体の消長を調べた。免疫期間中は免疫群と対照群の増体量には差は見られなかったが、ウイルスの攻撃によって対照群は発熱、嘔吐および神経症状を示しすべて死亡した。これに対し、免疫群は発熱と若干の食欲不振を示したもののすべて生存した。ウイルス攻撃後は両群ともウイルスの



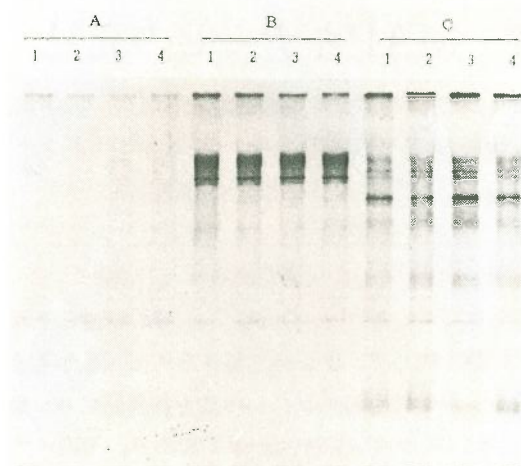


図2 免疫前(A), ISCOM免疫(B)および感染耐過(C)各血清によるウイルスタンパクの免疫沈降像  
数字は試験豚番号を示す

排泄がみられたが、免疫群のウイルス排泄量は対照群に比べて有意に低下していた。この結果は、ウイルス糖タンパクg II単独で子豚におけるオーエスキー病の症状を軽減する効果があることを示している。

免疫群では ISCOM 免疫によって補体要求性中和抗体が産生されたが、この中和活性はウイルスの攻撃によって大きく上昇し、感染が成立したことを示していた。ISCOM 免疫後と感染耐過後の抗体の性状を免疫沈降によって比較したところ、ISCOM 免疫血清は非還元状態で二つのウイルスタンパクとのみ反応したが、感染後はほとんどのウイルスタンパクに対する抗体が産生されており、抗体の性状に明かな違いがあることが判明した(図2)。このことから、ISCOM に含まれないウイルス抗原を用いることで、感染豚とワクチ

ン接種豚の識別ができると考えられた。

#### 4. おわりに

現在開発中のサブユニットワクチンにはウイルスから感染防御に有効な抗原を部分的に精製したもの<sup>8)</sup>や、それらの抗原をコードする遺伝子を適当なベクターに組み込んで発現させたもの<sup>4)</sup>がある。しかし、サブユニットワクチンに共通の問題は、有効抗原の精製が困難であることと、免疫原性が生ワクチンに比べて劣ることである。ここで紹介した ISCOM はこれらの問題点を解決するうえで有効な手段であると思われる。また、さらに有効なサブユニットワクチンを開発するうえで、他のオーエスキー病ウイルス糖タンパク感染防御効果を検討することが必要であると思われる。

#### 文 献

- 1) Eloit, M. et al. (1988) *Arch. Virol.* 99: 45-56
- 2) Hampl, H. et al. (1984) *J. Virol.* 52: 583-590
- 3) Ishii, H. et al. (1988) *J. Gen. Virol.* 69: 1411-1414
- 4) Marchioli, C.C. et al. (1987) *J. Virol.* 61: 3977-3982
- 5) Morein, B. et al. (1984) *Nature* 308: 457-460
- 6) Morein, B. (1990) *Vet. Microbiol.* 23: 79-84
- 7) 津田知幸・村上洋介・杉村崇明 (1990) 第38回日本ウイルス学会総会演説抄録 p. 145
- 8) Van Oirschot, J.T. et al. (1990) *Vet. Microbiol.* 23: 85-101
- 9) Van Oirschot, J.T. ed. (1988) *Vaccination and control of Aujeszky's disease*, Kluwer Academic Publishers

## 国内情報

## 新しい細胞分裂促進酵素—MAPキナーゼの発見

東京大学理学部

西田栄介

## 1. はじめに

様々な細胞機能は、それを担うタンパク質の機能の調節を通して制御され、正常な生命活動を維持する。例えば、細胞増殖を促進するタンパク質の機能が常に on になり続けてしまい、正常な制御がきかなくなれば、細胞は癌化してしまう。タンパク質機能の on-off の調節に最も便利でかつ効率的な機構として、生物が獲得してきたのが、タンパク質のリン酸化及びその逆反応である脱リン酸化である。実際、実に多岐にわたる生物機能において、タンパク質のリン酸化・脱リン酸化が決定的に重要な制御機構として働いていることが明らかになっている。そのタンパク質のリン酸化反応を触媒する酵素が、タンパク質キナーゼ（あるいは単にキナーゼ）である。

細胞の増殖や分裂という、生命の維持にとって最も根幹をなす活動において、タンパク質リン酸化が必須の制御機構と考えられるようになったのは比較的最近である。まず第1に、細胞増殖因子のシグナルを受けとる受容

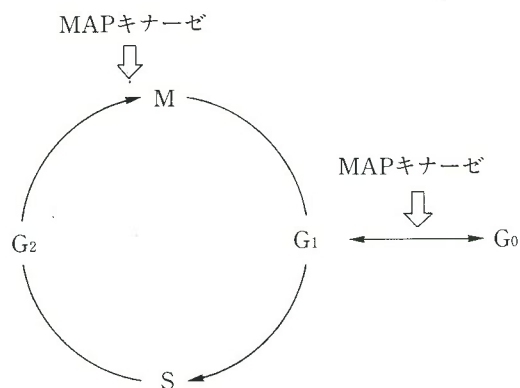


図1 細胞増殖と細胞周期の調節に働くMAPキナーゼ

体 (=レセプター) が、src 等の癌遺伝子産物と同じく、タンパク質キナーゼ（しかもタンパク質中のチロシン残基を特異的にリン酸化するチロシンキナーゼ）であり、そのキナーゼ活性が細胞増殖シグナルの伝達に必須であることが証明されたこと、第2に細胞周期のマスター制御因子として p34<sup>cdc2</sup> が酵母からヒトに至るまで真核生物に普遍的な分子として同定され、この分子がキナーゼであること、この2点が非常に強烈なインパクトを与えた。ここでこれから紹介したいと思う、我々の見出したMAPキナーゼというキナーゼ分子も、この2点、すなわち、増殖因子レセプターと p34<sup>cdc2</sup> と深く関わる。

## 2. 細胞増殖シグナル伝達酵素としてのMAPキナーゼ

細胞増殖因子レセプター（これは細胞膜に存在する）から核へと増殖シグナルが伝達され、新たな mRNA やタンパク質の合成が引き起こされることが静止期（G<sub>0</sub> 期、図1参照）にある細胞がS期に移行してDNA合成（複製）を開始するために必要不可欠である。この時のレセプターから核へのシグナルの伝達機構の解明は、現代の細胞生物学の主要な課題の一つとなっている。ここで、細胞内に存在するタンパク質キナーゼ（群）がシグナルの伝播役としての地位を占めると推定されている。とりわけ、キナーゼが次のキナーゼをリン酸化して活性化していくというキナーゼの連鎖によって情報が伝達されると考える“キナーゼカスケード仮説”が有望視されている。このシグナル伝達における細胞内キナーゼの重要性は、ごく最近、Raf-1（癌遺伝

子産物であり、細胞内タンパク質キナーゼでもある)が増殖因子のシグナル伝達に必要であることが示されて<sup>1)</sup>、ますます注目されている。

我々は、MAP2(細胞骨格タンパク質の一種)を *in vitro* の基質に用いることで、静止期(G<sub>0</sub>期)哺乳類培養細胞を増殖因子で刺激した時に活性化するキナーゼ(分子量40~45kDa)を新たに見出し<sup>2-5)</sup>、MAPキナーゼ(当初はMAP2キナーゼ)と名付けた。MAPキナーゼは、従来からタンパク質キナーゼ一般の *in vitro* の基質として用いられてきたヒストンのガゼインをほとんどリン酸化しえないというユニークな特徴を有しており、このことが発見の遅れた一つの原因となっている。ところで、このMAPキナーゼの際だった特徴は、調べた限り全ての増殖刺激(EGF, PDGF, FGFなどの細胞増殖因子やTPAなどの発癌プロモーター)で共通に活性化することである。種々の増殖刺激はそのレセプターも異なり、またその刺激が引き起こす細胞応答も様々である。しかし、全ての増殖刺激に共通していることは、細胞をS期(=DNA合成)へと移行させることである。言い換えると、種々の増殖刺激は、S期への移行という本来の目的のために、どこかでそのシグナルが共通の点へ合流してくるはずである。MAPキナーゼは、種々の増殖刺激後1分でほぼ最大に活性化するが、このMAPキナーゼの活性化こそが、増殖シグナルの最初の合

流点ではないのだろうか? 我々は、現在、この魅力的な仮説を検証するための実験に取り組んでいる。

### 3. 細胞分裂促進酵素としてのMAPキナーゼ

細胞増殖因子によってG<sub>0</sub>期から脱出した細胞は、通常の細胞周期を回り始める(図1)。この細胞周期は、遺伝子の複製(DNA複製)(=S期)と複製された遺伝子の分配と細胞の二分(=M期)の二つの事象を中心とする。p34<sup>cdc2</sup>(前述)は、サイクリンと複合体をつくり、MPF(M期促進因子)となり、細胞がM期へ進行するためのマスター制御因子として働く<sup>6)</sup>。一方、ごく最近、S期の開始にもp34<sup>cdc2</sup>が中心的役割を果たすことが示された<sup>7)</sup>。したがって、細胞周期全体がp34<sup>cdc2</sup>というキナーゼ分子の制御下にあると言っても過言ではない。

ところで、M期の様々な重要な細胞内事象、核膜崩壊、染色体凝集や微小管再構築(=紡錘体形成)はリン酸化によって制御されていると考えられており、実際、M期にタンパク質リン酸化の著しい増加が認められる。我々は、M期にもMAPキナーゼが活性化するのではないかと考え、*Xenopus*卵を使って実験したところ、M期にMAPキナーゼの劇的な活性上昇の起こることを見出した<sup>8)</sup>(図1参照)。しかも、微小管(細胞形態を規定す

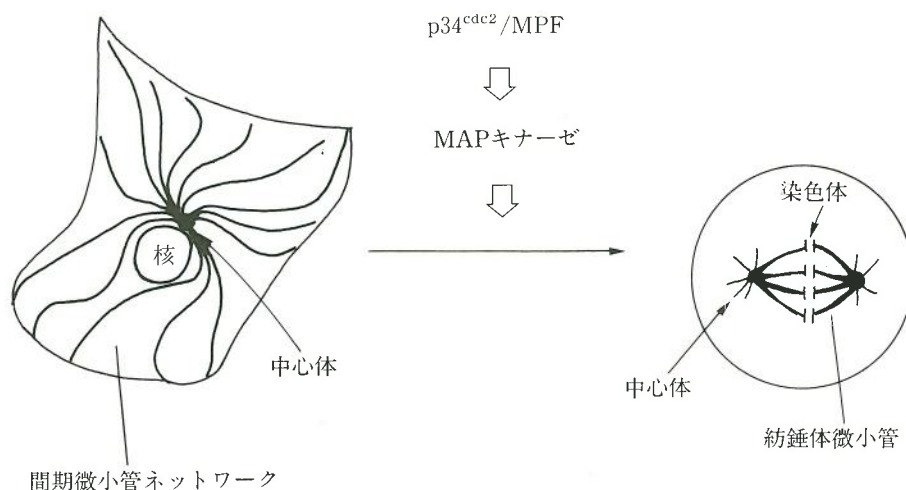


図2 MAPキナーゼのM期(細胞分裂期)における機能

る細胞骨格)が間期(=M期以外)型から、遺伝子分配を司る装置、即ち紡錘体微小管、へと変換するためにMAPキナーゼが重要な機能を担うことを明らかにした(図2)<sup>9)</sup>。さらに、M期でのMAPキナーゼの活性化は、 $p34^{cdc2}$ の支配を受けていることも明らかにした<sup>9)</sup>(図2)。したがって、M期にもキナーゼカスケード( $p34^{cdc2} \rightarrow$  MAPキナーゼ $\rightarrow$ 微小管再構築)が存在し、細胞分裂を引き起こすために機能していることがわかった。なお、M期におけるMAPキナーゼの機能については、最近の我々の総説<sup>10)</sup>を参照して頂けたら幸いである。

前述のように、 $p34^{cdc2}$ はS期開始にも働く。それでは、MAPキナーゼはどうだろうか?  $G_0/G_1$ 期やM期でのMAPキナーゼの活性化機構及びターゲットは? これらの非常に重要な課題に答えるために、現在、我々は、MAPキナーゼのcDNAクローニング<sup>9)</sup>や抗体の作製を行ない、様々な分子生物学的及び細胞生物学的解析を進めている。MAPキナーゼの機能の解明が、細胞増殖や細胞分裂、そして細胞周期、という生命の根本的活動を理解あるいは解明するための不可欠のステップになるであろうと考えている。

なお、MAPキナーゼは、細胞が分化する際のシグナル伝達にも関与することがわかっ

ている<sup>4)</sup>。MAPキナーゼの機能の多様性は、生物の機能の多様性を写す鏡のように思える。MAPキナーゼをめぐる研究は、今後も予想もできない展開を見せてくれるのではないか。我々自身もその展開を今後も担っていきたい。

## 文 献

- 1) Kolch, W., G. Heidecker, P. Lloyd and U.R. Rapp (1991) *Nature* 349:426-428
- 2) Hoshi, M., E. Nishida and H. Sakai (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 5396-5401
- 3) Hoshi, M., E. Nishida and H. Sakai (1989) *Eur. J. Biochem.* 184: 477-486
- 4) Gotoh, Y., E. Nishida, T. Yamashita, M. Hoshi, M. Kawakami and H. Sakai (1990) *Eur. J. Biochem.* 193: 661-669
- 5) Gotoh, Y., E. Nishida and H. Sakai (1990) *Eur. J. Biochem.* 193: 671-674
- 6) Nurse, P. (1990) *Nature* 344: 503-508
- 7) Broek, D., R. Bartlett, K. Crawford and P. Nurse (1991) *Nature* 349: 388-393
- 8) Gotoh, Y., E. Nishida, S. Matsuda, N. Shiina, H. Kosako, K. Shiokawa, T. Akiyama, K. Ohta and H. Sakai (1991) *Nature* 349: 251-254
- 9) Gotoh, Y., K. Moriyama, S. Matsuda, E. Okumura, T. Kishimoto, H. Kawasaki, K. Suzuki, I. Yahara, H. Sakai and E. Nishida (1991) submitted
- 10) 後藤由季子・西田栄介(1991) 細胞工学(印刷中)

## 国内情報

# シャトルカルスシステムによる 形質転換カンキツの作出

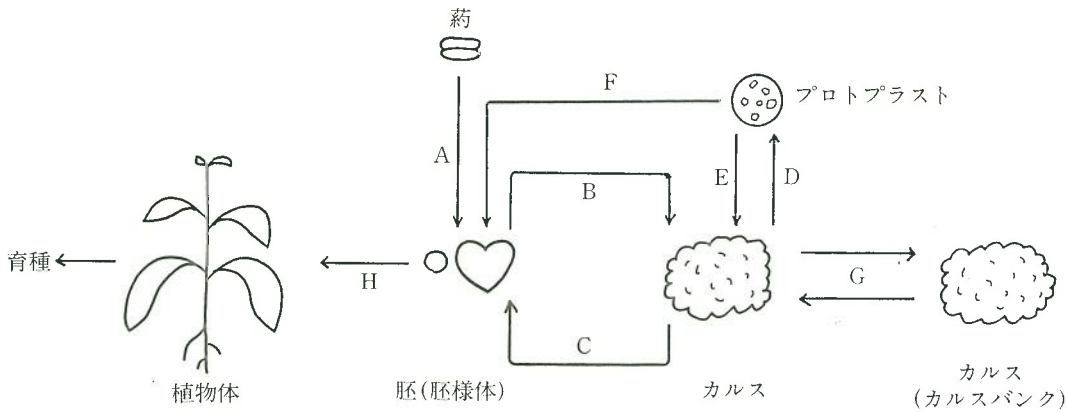
農林水産省 果樹試験場興津支場 育種第2研究室

日高哲志

## はじめに

外来遺伝子の導入は多くの植物で試みられているが、木本植物に関する報告は少ない。その原因のひとつは、木本植物においては安定した再分化系の開発が余り進んでいないた

めと思われる。しかし、我々はカンキツにおいて、薬培養、カルス、あるいはカルスからのプロトプラスト培養を相互に連携させた系を開発した。これは、胚あるいは胚様体からのカルス作出及び形成されたカルスから再び胚様体を形成させる系を中心とするものであり、我々は、この系を“シャトルカルスシス



第1図 シヤトルカルスシステムを核としたカンキツの組織培養

A: 薬培養 B: 胚様体分化能を持つカルスの誘導 C: 胚様体形成  
D: プロトプラストの単離、培養 E: 胚様体分化能を持つカルスの再誘導  
F: 胚様体形成 G: カルス培養 H: 植物体形成

テム(図1)”と名付けた。この系を利用して我々はいくつかの実験を行っているが、*Agrobacterium tumefaciens* (A. t.) を利用したカンキツの形質転換もそのうちのひとつである<sup>2)</sup>。以下にその概要を紹介する。

### 1. A. t. とカンキツカルスの共存培養

“ワシントンネーブル” オレンジ, “太田” ポンカン, “カラ” マンダリンの幼胚及び“トロビタ” オレンジの花粉起源胚様体から作出したカルスを用いた。これらのカルスは、液体培地による処理により1コロニーあたり1~10個の細胞からなる。A. t. は、カナマイシン耐性遺伝子を持つバイナリーベクターを持ったもの(A415株)と、ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つコインテグレイティブベクターを持ったもの(GV3010株)を用いた。これらのA. t. とカンキツカルスを、カルス継代培地と同様の組成のMS液体培地で3~7日間共存培養した。共存培養は、ひとつの区を静置培養、他方を振盪培養とし、共存培養期間による影響を調査するため、3, 5, 7日目にサンプリングした。

### 2. 耐性カルスの1次選抜

カルス増殖のために蔗糖0.2Mを加えたMS培地に、カナマイシン100 $\mu$ g/mlあるいはハ

イグロマイシン20 $\mu$ g/mlを添加した選抜培地を第1回目の選抜培地とした。

培養開始後6~10週間で、白色のカルスコロニーが増殖してきた。それらは“トロビタ” オレンジ及び“ワシントンネーブル” オレンジのカルスで、静置培養区で認められ、振盪培養を行なったものでは認められなかった。また、“太田” ポンカン及び“カラ” マンダリンでは、静置培養及び振盪培養のどちらにおいても耐性カルスコロニーの形成は認められなかった。また増殖したカルスの中に、黄緑色の胚様体が認められるものもあった。第1選抜における耐性カルスの出現率(見かけの転換率)は、供試したカルスの状態によっても変化するようで、安定しなかったが、20%以上を示すものもあった。A415あるいはGV3010株とも3日間の共存培養を行った場合に最も高い転換率を示し、7日間の共存培養では、見かけの転換率は両者とも低下した(表1)。

表1. 共存培養が見かけの形質転換率に及ぼす影響

供試カンキツ	菌株	見かけの形質転換率 <sup>a</sup>		
		共存培養の日数		
		3	5	7
“トロビタ”オレンジ	A415	$6.3 \times 10^{-3}$	$1.7 \times 10^{-5}$	$2.3 \times 10^{-6}$
	GV3010	$6.1 \times 10^{-3}$	$4.0 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-6}$
“ワシントン ネーブル”オレンジ	A415	$3.3 \times 10^{-3}$	$1.4 \times 10^{-5}$	$5.6 \times 10^{-6}$
	GV3010	$7.0 \times 10^{-3}$	$5.4 \times 10^{-3}$	$3.0 \times 10^{-6}$

a: 耐性カルスの出現率(コロニーベース)

### 3. カルス（胚様体）の2次選抜

第1次選抜培地で形成されたカナマイシンあるいはハイグロマイシン耐性カルスを、1次選抜の2倍濃度の抗生物質、すなわち、カナマイシン200 $\mu$ g/mlあるいはハイグロマイシン40 $\mu$ g/mlを加えた第2選抜培地に植え換えてさらに選抜を行なった。これらの培地は、蔗糖0.2M（カルス増殖）あるいはガラクトース及びソルビトールをそれぞれ0.1Mずつ（胚様体形成）添加したMS培地とした。また、胚様体からカルスの再誘導のため、蔗糖0.2Mにカイネチン50 $\mu$ Mを添加した培地も用いた。

この第2選抜のカルス増殖培地に移したカルスは、増殖速度はいくらか低下したものの、それでも80%前後が増殖した。しかし、胚様体形成培地においては、カルスから胚様体を形成するものは少なかった。

胚様体では、いくつかでさらなる成長が認められた。しかし、褐変、枯死するものも認められた。また、カルス誘導培地に移した胚様体では、約20%でカルス形成が認められた。

### 4. 植物体の作出とサザンチェック

第2選抜培地上で形成された胚様体は、ガラクトース及びソルビトールをそれぞれ0.1Mずつと、ジベレリン1 $\mu$ Mを含むMS寒天（0.8%）培地8mlを含む培地に植え換えて植物体を形成させた。

これらの植物体及びカルスから全DNAを抽出し、常法によりサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、耐性遺伝子を持っていることが明らかになった。

### おわりに

本実験の結果は *Agrobacterium* による形質転換を行なう際に問題となるいくつかの点を示唆している。ひとつは植物細胞の細胞壁の役割である。すなわち、*A.t.*の感染には、必ずしも“傷ついた”細胞を必要とはしない

ということである。さらに、形質転換体は静止培養による共存培養で得られ、振盪培養では得られなかった。このことは、*A.t.*によるカンキツの形質転換において、菌の宿主細胞への接触も何等かの重要な要因になっていることを示唆している。また、本実験では、“ワシントンネーブル”オレンジと、“トロビタ”オレンジで形質転換体を得られたが、“太田”ポンカンと“カラ”マンダリンでは得られなかった。これが *A.t.*の宿主範囲と関係しているのかどうかは現在のところはっきりしていない。

本実験における見かけ上の形質転換率は、カルスコロニー当たりで約0.05%であった。細胞1個当たりの見かけの形質転換率は少なくとも0.005%か、それ以上となると思われる。用いたカルスコロニーは含んだ細胞数が少なく、また、用いた抗生物質濃度に対する感受性は十分であるので（第1選抜の25%の濃度でカルスの増殖は阻害される）、選抜されたカルスコロニーにおいて、非形質転換細胞と形質転換細胞が混同している可能性は低いと思われる。また、シャトルカルスシステムにより、カルスの継代と胚様体の形成を行ったので、形質転換植物がキメラである可能性はほとんどないと思われる。

以上、カンキツにおいても *A.t.*による形質転換法が明らかになったが、その後、前述したような耐性カルスが得られない品種あるいは系統が他にもあることが判明した。しかし、この問題は手法等を工夫することによって解決できる見通しである。

形質転換法は、現在のところは多くが基礎的な実験にとどまっているが、今後、有用な遺伝子がクローニングされるにつれ、応用的な研究もさらに増加するものと思われる。

### 文 献

- 1) Hidaka, T. and M. Omura (1989) *Bull. Fruit Tree Res. Stn.* B16: 1-17
- 2) Hidaka, T., M. Omura, M. Ugaki, M. Tomiyama, A. Kato, M. Ohshima and F. Motoyoshi (1990) *Japan. J. Breed.* 40: 199-207

## 国内情報

# キイロショウジョウバエ成虫原基細胞の *in vitro* 培養, 株の樹立, 解析

三菱化成生命科学研究所 分子生物学研究部

三宅 端

## 1. まえおき

### キイロショウジョウバエとは?

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は極く小型 (体長1~2 mm, 体重約1 mg) の果実バエである。これは1900年代の極く初期から、遺伝学の材料として使われ始め、今や、近代生物学の最も重要なモデル材料となっている。その理由は、飼い易い、染色体数が少い、突然変異体の種類、数が多く、それらの遺伝子座もきまっている等の基礎的な事柄もあるが、それに加え1980年頃から、特定の遺伝子をクローン化する方法、それら遺伝子を個体に導入する方法 (個体レベルでの形質転換)<sup>1)</sup> 等が確立された事が極めて大きい。

## 2. キイロショウジョウバエ細胞の

### *in vitro* 培養

このように魅力的な材料を使って、複雑な生命現象を細胞レベルで調べたいというのは誰しも考える事で、その一環として、このハエの細胞を *in vitro* (ガラス器内) で培養する事が、1950年頃から盛んになり、種々の開拓的研究により今ではかなり実用的な域に達している<sup>2), 3)</sup>。しかし、ショウジョウバエは完全変態昆虫であるから、胚—幼虫—蛹—成虫の発生段階を通るが、細胞培養が容易で、無限に増殖する、いわゆる細胞株までもっていけるのは主に胚細胞であり、幼虫にせよ、成虫にせよ分化した器管から細胞培養を始め、株化までもって行くのは現在でもそう容易ではない。

## 3. キイロショウジョウバエの成虫原基<sup>4)</sup>

先に述べたように、このハエは、幼虫から蛹を経て、成虫になるが、この時、幼虫を構成している細胞の殆どはこわれ、成虫を構成する各部分は、幼虫の中に存在する成虫原基 (imaginal disc) という円盤状の構造から作られる。図1にあるように、この時、成虫の各部分毎に対応する成虫原基が存在し、例えば、眼—触角原基からは、成虫の眼—触角とその周囲の構造が作られ、翅—胸部原基からは翅とそのつけねの部分が作られる。スイスのハドーンは、この原基を使って発生生物学上極めて大きな意味をもつ研究を行なった。

a : 眼-触角原基 b : 翅-胸部原基 c : 平均棍原基

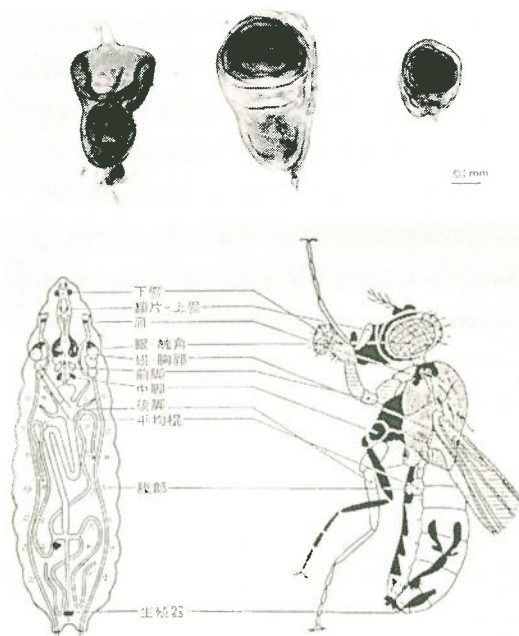


図1 キイロショウジョウバエ成虫原基およびそれらと成虫の各部分の対応図

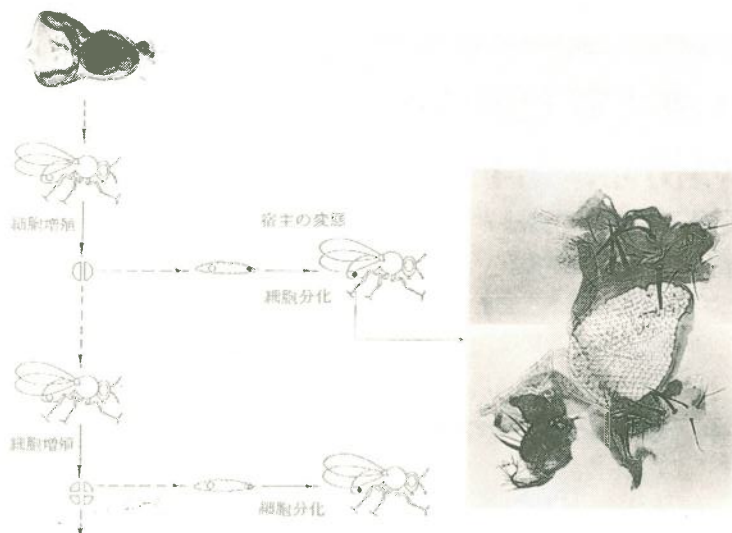


図2 成虫原基の移植実験

すなわち、彼はまず、成虫原基を幾つかに切り、その一つを成虫の腹腔に移植した(図2)。しばらくして、このハエの腹部をひらいてみると移植片は細胞増殖を起こし、大きな細胞塊となっていた。又、一方、成虫原基の他の一片を変態直前の幼虫の腹腔に移植し、この幼虫が変態し成虫になるまでまって(約1週間)この成虫の腹部をひらくと、そこでは移植片も分化し、成虫構造の一部を作っていた。この説明としては、成虫腹腔では、もはや変態ホルモンの制御はないため移植片の細胞は増殖の道へとすすみ、幼虫腹腔では、宿主と共に、変態ホルモン(20-ヒドロキシエクダイゾン)の調節を受け成虫構造を作る方向へと進むのだとされている。更に彼の実験から、移植した成虫原基の種類により幼虫腹腔で作られる成虫構造も定まっているということも明らかとなった。すなわち、翅の原基の断片を移植すれば、作られる構造は常に翅の1部であり、肢の原基の一片を移植すれば肢の1部の構造が作られてくるのである。このことを発生学の用語で解説すれば、成虫原基の細胞は、まだ分化(differentiation)はしていないが、発生運命は既に決定(determination)されている状態にあるということになる。更に彼は成虫腹腔への移植—摘出→別の成虫の腹腔への移植を繰り返し、その途中で1部を幼虫腹腔へ移植しその分化能を調べた。この実験の結果、成虫での継代17代目までは、こ

の決定は正しく維持される(すなわち、平均棍原基由来のものは平均棍の一部の構造のみをつくる)、しかし、その後は決定が狂ったもの、すなわち、平均棍原基由来なのに平均棍以外の構造(彼の実験では眼の構造の一部)を作るものも出てくることを発見し、この現象を決定の変換(transdetermination)と名付けた。このことは、成虫原基細胞における決定が、かなりしつかりした安定なものであるが、100%安定というわけではないというを示している。彼は、更に、成虫での継代をもっと重ねると、もはや、幼虫に移植しても、成虫構造を作れないようになる場合のあることも示した。

#### 4. キイロショウジョウバエの成虫原基細胞の*in vitro*培養

前述の如く、成虫原基細胞は既決定、未分化という状態にあることが示されたが、もし、この細胞を、この性質をもったまま*in vitro*で培養し、できれば株化までもっていければ、“決定”や“分化”の機構を分子のレベルで解明するために極めて有用な系となると思われる。この目的で世界の各地で成虫原基細胞の*in vitro*培養—株化の試みがなされたが、いずれも成功しなかった。我々の研究室でも、今までに数人の研究者がこれにチャレンジしたが達成できなかった。ところが、4年前、その頃までに胚細胞の系で蓄積してきた諸知見を基に、とうとうこれに成功した(宇井ら、1987)<sup>9)</sup>。その方法の大筋は、まず無菌幼虫をつくり、それを3令(最終令)まで育て、外科的に成虫原基をとり出し、酵素(プロテアーゼVIII)処理と物理的力(強いピペツティング)により、バラバラの細胞集団とし、これをconditioningした培地で微量培養するというものである。ここで成功の理由と考えられることとしては、1)ハエ系統として、胚細胞での経験から株化しやすいことの判った特定の系統を使ったこと、2)培地をconditioningするのに、この特定系統の胚細胞の初代培養2週間目の培養上清を使ったこと、の二つが大きい。いずれにせよこの条件では通常2~3か月程度で無限に増殖する株細胞



が樹立される(口絵1)。現在までに30株余が樹立されている。この過程で判ったこととして、成虫原基の種類ごとに株化の容易さが異なるということがある<sup>9)</sup>。最も容易なのは翅-胸部原基で成功率は53%に達するが、以下、平均棍原基(40%)、眼-触角原基の触角部分(36%)、眼-触角原基全体(6%)と下り、眼-触角原基の眼部分、肢原基については未だ成功していない。因みに各種原基を混合したものでは、約10%という数字が出ている。これらはもちろん、各原基細胞の増殖に要求される条件や因子のちがいにもよるだろうが、原基採取時の各原基の発生段階の差も影響していると考えられる。

### 5. *in vitro* で培養した細胞の分化能

さて、このように *in vitro* で培養した細胞

は成虫原基細胞としての分化能を持ちつづけているのだろうか？ 我々はこの知るために、培養の種々の時期に、自然に出来てくる細胞塊を幼虫の腹腔内に移植し、その幼虫の変態後、成虫の腹腔をひらき移植片の変化を調べた(図3)。その結果、培養初期の細胞塊は高頻度で成虫構造の一部へと分化した。もっともよく見られるのは袋の内側に内向きに細毛の生えた構造や、同様に袋の内側に剛毛(これは生体では四つの細胞, shaft, socket, glia, neuron からなる)の生えた構造である(口絵2)。これらはいずれも成虫の体表に多数存在するものである。残念なことに、このような能力は培養、継代を重ねるに従って失われていき、培養開始後2~3か月では極めて低率(0~10%程度)になる。しかし、このような複雑な構造ではないが、クチクラからなる袋状構造を作る能力は比較的長期間維

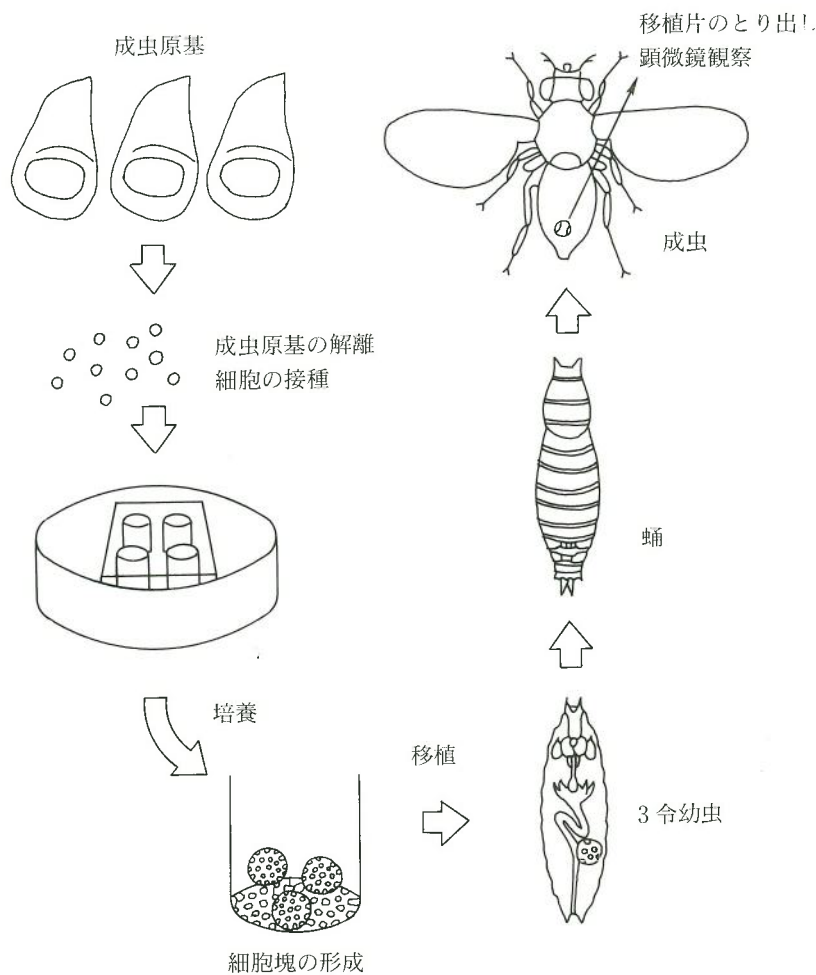


図3 成虫原基の培養と移植手順

持される。この場合は、高次構造を作る能力は失われたが成虫体表を作るクチクラを生産するという分化は起こっていることを示すものと考えられる。また、興味深いことに、これらの実験の中から、“決定変換”を示すと考えられるものも見出された。触角原基細胞を8.8か月培養してテストすると翅の縁と考えられる構造を作った例とか、翅の原基を12.1か月培養すると物の一部を作った例とかがそれである。このような決定変換は現在までに6例見つかっている。

ところで、これまで述べてきた例はいずれも分化の場として幼虫の腹腔を利用しているが、もし、前述の説明通りここで本質的なのが変態ホルモンの作用であるなら、*in vitro* 培養系に変態ホルモンを加えることにより、同様の变化を起こせるであろうということが考えられる。我々は、これを試み、少なくとも、培養初期の細胞塊については成功した。すなわち、翅原基細胞を19日間培養し、そこで、変態ホルモンを加え、17日間培養を続けると、内側に、内向きに細毛を生やした袋状の構造やクチクラからなる袋状の構造が作られた。これは、この時期の細胞が分化を開始するには変態ホルモンを与えるだけでよいということを示している。

以上述べてきたように、成虫原基細胞は

*in vitro* で培養しても、ある程度分化能を持ちつづけることが明らかとなった。また、これらは、無限に増え続ける細胞株にもなったが、この際極めて低率であるとはいえ、分化能を示すものがあったというのは驚くべきことである。分子レベルで、決定、決定変換、分化の機構を解明するには、まだ *in vitro* 培養による分化能低下を如何に抑えるかという大きな問題を解決しなければならないが、我々の仕事はその第一歩ともいえるべきもので、今後の発展が期待される。

## 文 献

- 1) Rubin, G.M. and A.C. Spradling (1982) *Science*, 218: 348-353
- 2) 黒田行昭 編著 (1978) 動物組織培養法 共立出版 pp. 348-367
- 3) 三宅 端ら 編著 (1984) 昆虫のバイオテクノロジー—マニュアル—ドロソフィラの生物学と分子生物学 講談社サイエンティフィック, pp. 32-76
- 4) Ursprung, H. and R. Nöthiger ed.(1972) *The Biology of Imaginal Disks*, Springer-Verlag
- 5) Ui, K., R. Ueda and T. Miyake (1987) *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 23: 707-711
- 6) Ui, K., R. Ueda and T. Miyake (1988) *Jpn. J. Genet.* 63: 33-41

## 文献情報

## 相同組換えを用いた眠り病原虫(トリパノゾーマ・ブルセイ)の遺伝子組換え体の作出

トリパノゾーマは宿主の血液および組織内に寄生する鞭毛原虫で、昆虫(眠り病の場合はツェツェバエ)によって媒介される。熱帯地方での原虫病による被害は大きく、ヒト眠り病の他、家畜のトリパノゾーマ病が畜産生産の大きな阻害要因となっている。

本報では、pUCプラスミドをベクターとして用いた相同組換えによって、トリパノゾーマ染色体に外来遺伝子(*neo*: neomycin phosphotransferase)を導入し、染色体に組み込まれた状態で遺伝子発現を可能としたこと、また少なくとも数か月間の培養で導入遺伝子のコピー数に変化が認められず、安定に娘細胞に遺伝子の伝達が行われることを述べている。

これまでに報告されたトリパノゾーマの遺伝子導入は、染色体外 DNA の形で一時的に外来遺伝子の発現を確認したものにすぎず、形質転換が継代後も伝わるかどうかの検討はされていなかった。また従来の方法ではトリパノゾーマ染色体上の特定の遺伝子機能を調べるための遺伝子破壊や遺伝子欠損、変異の導入などは原理的行なうことができなかった。

今回、遺伝子導入・発現に用いられたプラスミドの構成は、pUCプラスミドに procyclic acidic repetitive protein (PARP) 遺伝子プロモーターにネオマイシン耐性遺伝子(*neo*, G 418 耐性遺伝子とも呼ぶ)を連結し、さらに、トリパノゾーマ染色体の $\beta$ -チューブリンと $\alpha$ -チューブリンの間の非翻訳領域の配列(ほぼ真中にか所の *Mlu* 切断部位が存在) 639bp をつないだものである。

このプラスミド中に、一か所だけ存在する *Mlu* 切断部位を制限酵素を用いて線状とした後(環状プラスミドでは組換えは起きなかった)、ツェツェバエ寄生状態のトリパノゾ

法)を用いて DNA を体細胞中に取り込ませた。線状プラスミドとトリパノゾーマ染色体 DNA 間で相同組換えが起こり、トリパノゾーマ染色体中の標的遺伝子領域( $\beta$ -チューブリンと $\alpha$ -チューブリンの間の配列)に PARP プロモーター -*neo* を組込んだ。

組換えが起こったトリパノゾーマを非組換え体から分離するため、エレクトロポレーションから36~48時間後に、25 $\mu$ g/mlのG418を含む培地に移し、非組換え体(*neo* 遺伝子を持たない)の成長を抑制しつつ、組換え体のみを選択的に成長・増殖させた。さらに6日かけて徐々にG418濃度を50 $\mu$ g/mlまで上昇させ、厳しい条件でスクリーニングをかけて、耐性株を得た。なお、彼らは4回の独立な実験を行って、4回とも2週間目には耐性株が得られることを確認している。

このようにして得られた G418 耐性株において、*neo* 遺伝子が狙いどおりに染色体上に組み込まれたことをサザンブロットングで確認した。一つの耐性株の DNA をパルスフィールド電気泳動で分離し、*neo* 遺伝子をプローブとして検出したところ、第11番目、16番目の染色体バンド上でハイブリダイズした。この第11番、16番のバンドは、 $\beta$ -または $\alpha$ -チューブリン遺伝子プローブともハイブリダイズする染色体バンドであることから、トリパノゾーマ染色体に少なくとも1コピーの *neo* 遺伝子の存在が確認された。

ノザンブロットを用いて mRNA の転写を検討したところ、組換え体にはのみ *neo* 遺伝子の mRNA が検出され、非組換え体には全く検出されなかった。また pUC をコードする mRNA は検出されないことも確認された。さらに $\beta$ -チューブリン、 $\alpha$ -チューブリンとも正常な mRNA が発現されており、外来遺伝子の挿入による影響は認められなかった。

一つの耐性株の $\beta$ 、 $\alpha$ -チューブリン付近の塩基配列を決めたところ、プラスミド設計段階で狙ったとおりの染色体の配列中に挿入されていることが確認された。

本報告はトリパノゾーマ染色体上の特定位置への外来遺伝子導入を可能としたことにとどまらず、トリパノゾーマ本来の特定遺伝子

の破壊や欠損、変異を同様の手法を用いることで実現できるようにしたものと評価できる。本技術を利用すればトリパノゾーマの病原性遺伝子の解析が一層進むことが期待され、また弱毒株の作出による感染症予防のための生ワクチン開発の有力な方法となる可能性がある。

(抄訳 高田益宏——家衛試)

**Homologous recombination and stable transfection in the parasitic protozoan *Trypanosoma brucei***

Lee, G.-M., Van der L.H.T. Ploeg,  
*Science* 250 : 1583-1587 (1990)

文献情報

可溶性ウイルス受容体,  
sICAM-1を用いたライノウ  
イルスの感染阻害

ヒトライノウイルス (HRV) はピコルナウイルス科に属する脊椎動物ウイルスである。1本鎖RNA, 1分節ゲノムの構造でエンヴェロープをもたない正20面体の球状粒子形態をとっている。風邪の原因の50%がこのウイルスによると言われているが、HRVは免疫学的に交差反応を示さない100以上もの血清型を持っていることから、ワクチンで風邪を未然に防ぐことは、非常に困難であると考えられていた。ところが、最近血清型が沢山あるHRVのおよそ90%が、ヒトの細胞表面にある単一のレセプターと結合することがわかってきた。このレセプターが ICAM-1 と呼ばれるものである。

ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) は細胞間の接着分子であり、55kDaのポリペプチドのコアを基本とし、細胞型によって76から114kDaのグリコシル化された1本鎖の糖タンパクである。ICAM-1は免疫グロブリン・スーパージーン・ファミリーの一つであり、白血球細胞膜上に存在するインテグリン・スーパージーン・ファミリーの一つであるLFA-1のリガンドである。ICAM-1分子の1次構造は七つのドメインからなっ

ている。具体的にはN末端側から五つの免疫グロブリン様細胞外ドメイン、疎水性のトランスメンブレン・ドメイン、そしてC末側の短い細胞質ドメインから構成されている。一方、HRVの表面構造をX線解析すると“canyon”と呼ばれる幅が12~30Åで、深さ25Åの穴が60個存在している。ICAM-1とHRVとの結合はこの“canyon”にICAM-1の細胞外に露出しているドメインが入り込むことによって、HRVの細胞への感染が成立すると考えられている。

著者らは抗ICAM-1抗体が主要なライノウイルスグループの結合を阻止することから、ウイルス-受容体の拮抗作用はライノウイルス感染を阻害する有効な手段の一つになると考え、ICAM-1分子の可溶性物を作製し、これがHRV感染に特異的に作用し、有効な阻害剤であることを示した。

先に述べたようにICAM-1は五つの細胞外ドメイン、トランスメンブレン・ドメイン、細胞質ドメインから構成されているが、可溶性ICAM-1 (soluble ICAM-1) を産生させるためにトランスメンブレンと細胞外ドメインの境界にある453番目のコドン (GAG ; グルタミン酸をコードしている) を翻訳終止コドン (TAG) に置き換えた突然変異体を作製した。このsICAM-1遺伝子はCHO細胞内にトランスフェクトされ、sICAM-1を分泌する安定な細胞株CHO 118Aが得られた。この細胞株から産生されるsICAM-1の分子量は82kDaであることが確認され、これは元のICAM-1の分子量90kDaのうち、細胞膜に埋め込まれた部分と細胞内に存在する部分を欠いた五つの細胞外免疫グロブリン様ドメインと予想される大きさと一致した。またこのsICAM-1は膜結合ICAM-1に対して作製された三つのモノクローナル抗体、RR1/1, R6.5, CL203と結合することから、膜結合ICAM-1の構造をすべて持っていることが推測された。

まず、このsICAM-1を使って細胞変性効果 (CPE) を指標にして、ライノウイルスは感染が阻害されるか試験した。主要なHRV系統54を使用し、各濃度のsICAM-1をHe

La細胞に処理し、HRV54を感染させて4日後のCPEを観察すると $1\mu\text{g/ml}$ のsICAM-1処理では約50%、 $10\mu\text{g/ml}$ では90%以上の阻害が見られた。更に、このsICAM-1による阻害は特異的であることを調べるため、メジャーおよびマイナーサブグループの両ライノウイルス、他のピコルナウイルス、全く関係のない、エンヴェロープをもつDNAウイルスであるHSV-1を使ってCPEを観察した。sICAM-1を $5\mu\text{g/ml}$ 、HeLa細胞に処理し、各種ウイルスを感染させた。その結果、ICAM-1を受容体とするHRV54とコクサッキーA13の感染は完全に抑制された。一方、別のウイルス受容体をもつHRV2、コクサッキーB、ポリオウイルス、HSV-1は抑制されなかった。また、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンでラベルしたウイルスを使って、細胞へのウイルス結合におけるsICAM-1の効果についても測定したが、sICAM-1はウイルス粒子結合を特異的に阻害した。

しかし、60ある“canyon”のうち幾つがsICAM-1によって占められれば感染はブロックされるのか、またsICAM-1の五つの免疫グロブリン様ドメインのどの部分に関与しているのかについては今後に残された課題である。現在、著者らによって、ドメインの1と2がHRVとの結合部位に関与し、またLFA-1との結合部位ともオーバーラップしていることがわかってきている。

以上より、sICAM-1、あるいはこの誘導体は抗ウイルス剤として利用価値の高いものと考えられる。レセプターとウイルスとの結合が直接阻害されることはウイルス複製サイクルの最も早い時期に作用していること、レセプターの可溶性物を薬剤としているから、薬剤抵抗性変異が発生しても感染性を示さないという利点もある。また、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)とヘルパーT細胞表面の受容体であるCD4でもHRVにおけるICAM-1と同様の関係があり、可溶性CD4は現在AIDSに対して臨床効果試験が行われている。このように、可溶性ウイルス受容体の利用は新しい抗ウイルス剤として注目されている。

(抄訳：深野泰生——東北大)

#### A soluble form of intercellular adhesion molecule-1 inhibits rhinovirus infection

Marlin, S.D., D.E. Staunton, T.A. Springer, C. Stratowa, W. Sommergruber and V.J.

Merluzzi

*Nature* 344: 70, 1 March 1990

#### 文献情報

#### 第5または第18正常染色体の導入による、ヒト大腸癌細胞の腫瘍原性の抑制

細胞の腫瘍化には、体細胞突然変異による癌遺伝子の活性化と、癌抑制遺伝子の不活性化が関与すると考えられている。

大腸正常腺組織細胞が良性の腺腫を経て大腸癌となる過程には、K-rasあるいはH-ras癌遺伝子の活性化や染色体5qにあるAPC (adenomatous polyposis coli) および18qにあるDCC (deleted in colorectal carcinoma) 遺伝子の相同染色体上の欠損が関与するとされている。

本論文では大腸癌由来細胞株COKFuに正常染色体を導入し、遺伝子の欠損と腫瘍原性との関係について調べている。

正常染色体の導入は、ネオマイシン耐性遺伝子(Neo)を正常ヒト染色体5、11あるいは18にそれぞれ組込んだヒトの染色体を含むマウスA9細胞株をコロセミド処理によりマイクロセル(微小核細胞)化し、COKFu細胞とポリエチレングリコール処理し細胞融合により行なっている。この方法はマイクロセル法と呼ばれ、ヒト細胞ではマイクロセル誘導が困難なためヒト染色体導入マウス細胞が一般的に利用されている。G418薬剤耐性選択により得られた細胞を、Neo遺伝子の検出および第5染色体に特異的D5S6、第18染色体に特異的D18S5、第11染色体に特異的int 2 DNAをプローブにして、RFLP解析により導入された染色体を同定している。

第5または第18染色体の導入されたクローンは、液体培地中の倍加時間(doubling time)が親株の2~3倍になり、軟寒天上の

コロニー形成効率はそれぞれ0.46~0.05%と0.02~0%に減少した。これに対して第11染色体の導入されたクローンは、親株とほとんど変わらなかった。

ヌードマウスにクローンを移植すると、親株では1週間で腫瘍形成を認め4週間後には250mm<sup>3</sup>大になり、第11染色体の導入されたクローンでは腫瘍生育速度が半減するものの全てのマウスに腫瘍形成が認められた。しかし、第5または第18染色体の導入されたクローンでは、6か月を経ても腫瘍形成を認めなかった。

親株と第11染色体の導入されたクローンは同様の紡錘状の形態を示したが、第5染色体の導入されたクローンは、典型的な上皮細胞に見られる多角形状の細胞が密集した形態を示し、第18染色体の導入されたクローンは、平坦な形態を示した。

以上のことは、正常第5染色体および第18染色体上には大腸癌の腫瘍原性を抑制する癌抑制遺伝子があることを強く示している。

親株の染色体数は92本のものが最も多く、染色体の導入されたクローンでは93本と94本のもものが得られている。導入された染色体を核型分析から確かめることは難しいが、一本の染色体の導入により腫瘍原性を抑制する例がHeLa細胞やWilms腫瘍などで報告されており、COKFu細胞に対する抑制効果も第5または第18染色体の1本で十分だと著者らは考えている。

導入された染色体により形態学的変化が異なるため、機能的に異なる癌抑制遺伝子が第5染色体上と第18染色体上にあると考え、また、これらの染色体の導入されたクローンは正常粘膜細胞よりは生育が速く、未だに不死化したままであることから、大腸癌発生抑制には幾つかの癌抑制遺伝子が同時に働いていると著者らは考えている。

癌抑制遺伝子は相同染色体の両方が不活性化されることにより癌化に関与することから劣性癌遺伝子(recessive oncogene)とも呼ばれるが、APC遺伝子、DCC遺伝子は両方とも多くの大腸癌で相同染色体上の欠損が見られるので、COKFu細胞ではAPC、DCC遺

伝子が不活性化されており正常第5染色体あるいは第18染色体の導入により、APC、DCC遺伝子の機能が回復したものと考えている。

単一(一本)の染色体の導入、正確な導入遺伝子数および遺伝子産物を同定できれば本論文のもつ意義はさらに大きくなる。

染色体の導入されたクローンを逆選択(back selection)の条件下で培養しても復帰株(revertant)が得られておらず、ヌードマウスにクローンを移植した後6か月の長期間にわたり腫瘍が生じないことは、これまで報告されている例と比較して、導入された染色体が安定であることを示している。

大腸癌の癌化には複数の癌抑制遺伝子と癌遺伝子の一連の変化が必要と考えられているので、著者らは親株および染色体導入クローンでDCC遺伝子の発現レベル、p53癌抑制遺伝子、myc、K-ras-2、H-ras-1遺伝子の発現レベルを調べているが、さらに種々の癌遺伝子および癌抑制遺伝子の発現を検討する必要性を述べている。

(抄訳：大田方人——家衛試)

#### Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 5 or 18

Tanaka, K., M. Oshimura, R. Kikuchi, M. Seki, T. Hayashi and M. Miyake  
*Nature* 349: 340, 24 Jan. 1991

#### 文献情報

#### ミトコンドリア局在性 13kDaタンパク質と病原菌 毒素感受性

植物の雄性不稔とは、花粉、葯の未成熟によって正常な受精が行われない現象をいう。トウモロコシの場合、雄性不稔はミトコンドリアのDNAによって支配されており、核に存在する1対または2対の稔性回復遺伝子によって打破される。テキサス型細胞質雄性不稔(*cms-T*)をもつトウモロコシは、1950~60年代にかけてアメリカ南部のコーンベルト地帯で、一代雑種品種育成のために広く用い

られていた。しかし、この型の細胞質を持つトウモロコシに対して特異的に病原性を発揮する *Helminthosporium (Bipolaris) maydis* race Tによって栽培面積の約85%が被害を受け、壊滅的な打撃を被った。この事件から病害感受性と雄性不稔との関連が精力的に調べられた結果、①本病は、*H. maydis*の産生する HmT 毒素によってミトコンドリアが破壊されることによって生じる。②培養中に突然変異によって雄性不稔でなくなったものは、病害に対しても抵抗性になる。③*cms-T*ミトコンドリアでは、正常型ミトコンドリア中に認められない分子量 13kDa のタンパク質が存在する。④本タンパク質をコードする遺伝子(*T-urf 13*)は、ミトコンドリア DNA 上に存在しているが、26s rRNA 遺伝子や ATP 合成酵素遺伝子などが複雑に rearrangement して生じたものである。⑤*T-urf 13*を大腸菌の発現ベクターに組み込み、大腸菌をミトコンドリアに見立てて 13kDa タンパク質の及ぼす影響について調べたところ、13kDa タンパク質の発現によって、大腸菌は HmT 毒素に感受性となり、*cms-T*トウモロコシのミトコンドリアが受ける影響と類似の現象(細胞内イオンの漏出、酸素消費の停止)を示した。以上の結果から、13kDa タンパク質が、病原菌毒素に対する感受性を決定する重要な要因であることが判明したが、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。

Huang et al. は *T-urf 13*を酵母の発現ベクターに組み込み、13kDa タンパク質の発現と毒素感受性との関係を検討した。酵母のチトクロームオキシダーゼ Va サブユニット遺伝子のプロモーター下流にリーダー配列として *Neurospora crassa* の ATP 合成酵素のサブユニット 9 の輸送ペプチドをつなぎ、その後 *T-urf 13* を組み込んだ場合 (pJTH1) は、ATP9 と 13kDa タンパク質の融合タンパク質がミトコンドリアに運ばれた後、プロテアーゼによってプロセッシングされ、ほぼ intact な 13kDa タンパク質が生成されることがわかった。一方、リーダー配列を持たない con-

struct (pJTH2) は、酵母内で発現するものの、ミトコンドリアには運ばれなかった。これら二つの発現ベクターで形質転換した酵母を毒素存在下で生育を検討した。pJTH2 を持つ酵母は、毒素が添加された培地上で野生株と同様に生育できたのに対し、pJTH1 で形質転換した場合には、毒素によってその生育が著しく阻害された。以上の結果から、真核生物では 13kDa タンパク質がミトコンドリアに存在することが、毒素感受性となる重要な要因であるという直接証明を得た。

近年、正常型および T 型トウモロコシのミトコンドリア DNA ゲノムの遺伝子構造が明らかにされたが、その結果 *T-urf 13* 遺伝子は T 型トウモロコシのミトコンドリア DNA 上のみ存在していることが明らかになった。前述のように、この遺伝子は正常型 DNA 上に存在する遺伝子およびその周辺領域が複雑に組換えられて生じたものであり、本来無意味であったはずの配列が重要な形質を発現するに至った数少ない例として大変興味を持たれる。同時に、このタンパク質が病原菌感染時以外に果たしている機能に関しても、大いに注目される場所である。Levings III は、*T-urf 13* タンパク質のミトコンドリアでの存在形態を推定しているが、それによると本タンパク質は、N 末端部分を細胞質側に持ち、ポリペプチド鎖が 3 回膜を貫通しており、イオンチャンネルとして機能していると考えられた。

(抄訳：柄澤 明——東北大農)

**The Texas cytoplasm of maize: Cytoplasmic male sterility and disease sensitivity.**  
Levings III, C.S.

*Science* 250: 942-947 (1990)

**Expression in yeast of the T-URF13 protein from Texas male-sterile maize mitochondria confers sensitivity to methomyl and to Texas-cytoplasm-specific fungal toxins.**

Huang, J., S.-H. Lee, C. Lin, R. Medici, E. Hack and A.M. Myers

*EMBO J.* 9: 339-347 (1990)

海外便り

## ロングアシュトン試験場(英国)

農林水産省 果樹試験場 病害第1研究室  
石井英夫

### 機関の性格

日英科学技術協力に関する合意に基づく科学技術庁パートギャランティ研究員として、1990年9月までの1年間、ブリストル大学ロングアシュトン試験場に滞在した。同試験場は1903年、果樹及びサイダー（リンゴの果実酒）産業の振興を目的として設立された国立の研究機関であったが、「小さな政府」づくりを目指したサッチャー前政権誕生後の大幅な組織再編で機関の性格の著しい変更を余儀なくされた。また、ローザムステッド試験場をはじめとする他の研究機関と同様 MAFF（農業水産食品省）から離れ、現在はこれとは独立の AFRC（半官半民的な農業食品研究会議）に所属している。従来行っていた果樹研究を専ら園芸研究所の一部（かつてのイーストモーリング試験場）に委ねて、ロングアシュトン試験場は arable crops に関する研究機関に衣替えした。場の予算のうち MAFF からのものが占める割合は僅か20%に過ぎず、AFRCのほか、生産者団体や内外の民間企業に財政面で大きく依存している。

### 研究の概要

同試験場はロンドン、パディントン駅から西ヘインターシティ列車で1時間半余りのブリストル郊外にあり、機関の置かれた厳しい現状とは無縁であるかのように、辺りにはのどかな放牧地が広がり、また中世風の石組みの家々やパブなども見られる。そこは現在、作物環境科学（最近までは作物保護）と植物科学の二つの研究部からなり、前者には更に作物病理や分子植物病理、除草剤の作用機構などの七つの研究グループが、また後者には植物ホルモンの作用機構や生化学などに関す

る五つのグループが含まれる。このうち筆者の所属した作物病理の Dr. Hollomon（身分は日本の国立研究機関の主任研究官クラス）の研究室はアシスタントや若手のポスドク研究者、PhDやMScの学生、パートタイマー等の総勢14名で構成され、オオムギうどんこ病菌のエルゴステロール生合成阻害剤（EBI剤）感受性遺伝子（同ステロールの生合成中間体の脱メチル化に関与する酵素 P 450 をコード）のクローニングと塩基配列の解析、同遺伝子によるアカパンカビの形質転換と発現、うどんこ病菌や雲形病菌の EBI 剤耐性菌のステロール成分の分析、眼紋病菌その他の ELISA による診断などが実験室で所狭しと研究されていた。ロングアシュトンでもやや例外的であるとはいえ、一人の研究者がこれだけのチームを率いているのは全く驚きであり、それ故に筆者も人集めと金集めが研究の進展にいかにか大切であるかを目の当りにすることができた。このような環境の中で菌の薬剤耐性のテーマに取り組んだ筆者であったが、菌のアイソザイム分析や DNA とり、その他を楽しむうち瞬間に1年が過ぎ去り、家族共々未練を残しながらの帰国となった。

### 研究体制に見る違い

筆者の在外研究は6年前のオランダ、ワーゲンゲン農科大学でのそれに次いで2度目であったため、馴れた積りで生活を始めたが、所変われば品変わるで、英国とオランダでは人々のキャラクターもかなり異なる。個人主義を尊ぶといわれる英国では人々は概して一見クール。このため同国に滞在する外国人からの評判は芳しくない。それでも、頼みごとをした時などは皆親切にしてくれ、また職場



の人間関係も至ってフランクなところを見ると、結局のところ「要らぬ干渉はしない」ということのようにである。最近日本に滞在する外国人研究者の数も増えたが、果たして彼らの目に我々がどのように映っていることか。

研究が滞在の主たる目的ではあっても、1年の間にはその国のいろいろな姿が見えてくる。人頭税の導入や他の EC 諸国との協調性のなさが結局は命取りとなってサッチャー前首相も遂に退陣、代って47才のメジャー氏が新たな指導者に選ばれた。この若手の起用が如何なる結果を生むかは不透明であるが、これと似た話はロングアシュトンにもあった。総勢 300 人以上を擁する同試験場の長は40才台半ばの Prof. Shewry で植物生理関係の優秀な研究者であると聞く。とかく社会の閉鎖性や保守性が話題にのぼることの多い英国も、止むに止まれず大変革を試みているのであろうか。そして、1987年の国際植物保護会議で一緒に飲んだのが縁で筆者をロングアシュトンへ招いてくれた副所長の Dr. Brent はほどなく60才の定年を迎えるが、この人も元々は、有数の化学工業会社 ICI 社からの移籍組である。良きにつけ悪きにつけ、年功序列制や終身雇用制の下で長年仕事をしている筆者にとっては、様々な研究システムの違いを見るのは実に興味深かった。かつての国立研究所の民間への売却のほか、時には「Redundancy」と称して、研究者が AFRC から名指しで不要人員扱いされ、研究所を去る光景にも出くわした。また、若手研究者の多くは2~3年の期間雇用で働き、何箇所かを渡り歩こうちに運が良ければパーマネントのポストにありつける。何か彼らが消耗品扱いされて

いるようで気の毒でもあるが、彼らの多くは余り意に介していないらしい。職を求めて海外へも平気で渡って行く。そして、結果的にはそのような身分不安定な厳しさが研究者としての資質を育くむのであろう。それに引換え、日本の国立研究機関の場合はどうであろうか。公務員採用のためのペーパーテストに合格さえすれば、素人でも研究職に就くことができ、途中殆ど業績評価もなされないまま40年近い生活が一応は保証される。このように見えてくると、何か良ければ何かが悪く中庸を歩むのは難しいことのようにである。

#### 明日の発展のために

日本人の働き過ぎは英国でもよく知られている。確かにロングアシュトン試験場では、夜部屋に残っているのは外国人研究者くらいのものである。しかし、研究の非効率を考える時、本当の意味で我々が働き過ぎかどうかは疑わしい。英国は現在でも基礎研究の水準や効率の高さで定評があるが、専門のアシスタントやテクニシャンにも恵まれず、一から十までこなすことも少なくないのが日本の研究者。報告書作成などやたらと多いペーパーワークに会議の類い。そのような非効率なシステムに疑問すら持たない人もまだいるのが現状である。「国際化」の掛け声の下、学会その他で日本人が海外へ出かけたたり、海外から研究者を招く機会も増えた。しかし、定員の配置や煩雑極まりない事務手続き等は10年以上昔と余り変わりが無い。欧米から攻められ、またかりそめの泰平ムードにも乗って日本人の労働時間も短縮の方向へと進んでいるが、研究機関の場合これを補い得るシステムの改善が必要であろう。地理的条件や言語障壁に基づくハンディを克服して研究を進展させ、なおかつ人間らしいバランスのとれた家庭生活を何とか送れぬものであろうか。筆者は今42才。植物病原菌の薬剤耐性に加えて果樹の病害抵抗性をライフワークとして、10年後に迫った21世紀の訪れまでにそんな夢が実現することを願うものである。



国際学会レポート

## 「環境汚染と農業に関する国際シンポジウム」 に参加して

農林水産省 農業環境技術研究所 資源・環境動態研究室

袴田共之

「成長途上国」韓国の農業がこれからどう発展して行くのか？——この課題は「衰退途上国」かも知れないわが国にとっても、実は、重大な課題なのである。私の胸に、このことをつよく刻印してくれたのが、今回の韓国訪問であった。1990年9月の下旬、穏やかな日が続いたソウル。ソウル大学校農科大学農業開発研究所の主催するシンポジウムの本会議は21日にソウル大学校会議場で行われ、翌日から3日間は、エクスカージョン。さらに前後に半ば私的な見学を付け加えて、私にとってめったにない思索の1週間であった。その一部を紹介させて頂こうと思う。

### 緊張は横断幕から始まった

大きな横断幕が、ソウル大学校の構内を走る広い道路を跨いで何枚も掲げられている。私はそれを何気なくみていた。最初のうちは、学生運動への参加を呼びかけるものかと勝手に想像していた。多くは、ハングル文字で書かれているので、悲しいかな、私には単なる模様過ぎない。ところが、環境汚染とか農業とか国際とかの漢字の混ざった横断幕が目に入り、よくみると、英語もあって、それは間違いなくわれわれのシンポジウムを知らせる3色刷りの横断幕なのである。少し行くとまたある。主催者側の意気込みがだんだん伝わってくる。このシンポジウムに対する意気込みは、この期間を通じて、KBSテレビの特集番組用の取材、シンポジウムに集まった学者、研究者、学生の熱心な視線と質疑など至るところにうかがうことができた。

この意気込みが引き起こすとみられる私の緊張のピークは、講演直前ではなく、それが

終わって一旦弛緩した後、夜のレセプションが始まった直後にきたのである。挨拶で学長のWan Kyoo Cho先生は、戦後の復興を経て今回このように国際会議を開催できるようになったことを喜びたい、と誇らかに語られた。Cho先生はここに至る経過をかいつままで淡々と話されたが、それらを聞いて、なるほどと納得すると同時に、私は改めて極度に緊張した。私の脳裏に、朝鮮の歴史、特にわが国との関係史が浮かんでいた。

さて、この歴史は想像におまかせするとして、この辺で、シンポジウムの内容について紹介しなければならない。

### シンポジウムの講演から

本会議では、外国からの4名の演者と国内の5名の演者が講演を行った(表1)。

後者の講演の中には、法的規制やその制度に関する講演など興味深いものがあったが、それらは一部を除きハングル語の講演であったので、残念ながら私には聞くことができなかった。英語で行われ、私が聞くことのできた講演についてのみ簡単に紹介させて頂こうと思う。

Blackmer先生は、持続的農業の概念とそれに基づくご自分の実践について講演された。先生の働いておられるIowa州立大学は、アメリカの多くの大学の農学部などがそうであるように、農業研究・教育と同時に普及部門も抱えている。そのような性格をもつ同大学の「レオポルド持続的農業センター」ではとても優れた土壌診断システムが稼働している。この診断システムを使用して、肥料の施用量の再検討を行った例を紹介された。多くの地

域で過剰な施肥が行われている実態が判明し、詳しい検討を行った結果、無駄な肥料を削減することができた。具体的な例では、窒素肥料を123kg/haから48kg/haに減らしてもトウモロコシの収量を維持することができたという。Blackmer先生の講演は、後に触れるような韓国の増産目標を実現する際に今から考えるべき基準をアメリカの経験から提示したと同時に、日本の農業にとってもきわめて示唆に富むものであった。

Reneau先生は、土壌学者としての経験から、現在注目されている環境汚染にかかわる土壌中での物質の移動や反応に関する法則性とそれに関する最先端の話題を分かりやすく話された。一面で有用である化学物質が他面では汚染物質となって環境を悪化させている現状と、それらを人間が意識的に管理することの必要性を考えさせる講演であった。

台湾の李國欽先生は、残留農薬の問題とその解決策について話された。しかし、私はその最中にテレビ局による取材のために外に呼び出されてしまい、講演を聞くことができず、ここで紹介できる内容を持ち合わせていない。

私のすぐ後に講演された Yong Woong Kwon先生は「対外秘」であるがと断わって、韓国の工業地帯の大気汚染や酸性降下物のデータを示された。そこに示された雨および雪の最低pHは、わが国に比べむしろ高い値であった。

私の講演では、わが国が食料、とりわけ飼料を海外からの輸入に頼っていることにより、国内の窒素や燐が管理不能になってしまい、その結果として水域の富栄養化が起らざるを得ないことを話した。比較対照として、諸外国の例を引合いに出すのは当然として、そのほかに、牛の放牧地において窒素や燐の循環がいかに自然の力を利用してうまく機能しているかを示し、自然に従い自然に還えることの重要性を話した。

### その山村は今、近代化が始まった

エクスカージョンのバスは国道5号線を東に向け徐々に山深くなる道を進んだ。太白山

表1 「環境汚染と農業に関する国際シンポジウム」の講演一覧

演 題	演 者 (所属、国名)
1.工業化の農業環境に及ぼす影響	A.M.Blackmer (わい州立大学、U.S.A.)
2.土壌中の各種汚染質の移動と行方	R.B.Reneau (ゲージア州立大学、U.S.A.)
3.農薬の残留問題、その解決策	Gwo-Chen Li (台湾省農業薬物毒物試験所、中国)
4.畜産廃棄物の水質汚濁と農業環境に及ぼす影響	袴田共之 (農業環境技術研究所、日本)
5.韓国における大気汚染の作物被害	Yong Woong Kwon (ソウル大学校、韓国)
6.韓国における農産物の残留農薬の安全性	Young-Ho Jeong (農薬研究所、韓国)
7.韓国における農業用水の水質と土壌中重金属汚染の実態	Sun-Ho Yoo (ソウル大学校、韓国)
8.都市の拡張と農業環境の変化、課題と展望、韓国の場合	Chang-Ho Yim (国土開発研究院、韓国)
9.韓国の農業環境汚染の法的規制と保護対策	Yeon-Chang Koo (慶熙大学校、韓国)

註) 連名の講演もあったが、ここでは演者名のみ掲げた。プロシーディングが発行されているので、詳細を参照されたい場合は著者までお申しつけください。

脈を越えて東海(日本海の韓国名)へ抜けようというコースである。山脈の間の比較的低い谷や盆地には、たとえば榮州とか奉化といった中小都市があつて、そこには、ヨーロッパの街を思わせるハイカラなキリスト教会の尖塔が二つ三つと見えたりする。しかし、間もなく切り立った山肌が人家を谷底か傾斜の緩い中腹のテラスにしか居られなくしてしまう。そのような村々では、わが国ではかなり以前に消えてしまった伝統的農法が現実展開されている。家族総出の稲刈りは鎌を使った手刈であり、乾燥はもちろんハサ掛け、脱穀はせいぜい発動機の脱穀機。農作業の現場には子守の老人と路傍の草を食う茶色の牛の姿も見える。この辺りの農家では電気冷蔵庫、テレビ、電話が近年になってようやく入りだしたと案内のLee先生が説明してくれる。平野部では、もっと機械化されているように見かけたが、農村の近代化はこれからの課題だという。

わが国の高度成長が、国民生活に関しては、家電製品の普及→労働力の増加→所得の伸び→購買力の増大→自家用車の普及→……という螺旋状の変化をもたらしたことはよく知られたことであるが、農村では現在までに2段階の螺旋を回ってきたと考えることができる。

つまり、その変化は国民一般のそれに加えて農機具（第1段階は小型農機具、第2段階は大型農機具）の普及を契機にして展開されたのであった。いわば農業の工業化による経済発展であった。

ところで、この山岳道路、国道5号線は2年前に開通したばかりとのこと。それを聞いて思ったことは、わが国の農村地域に敷かれた舗装道路を通して多くの農民が街へ街へと疾走した姿であった。太白山周辺の農民も奉化や榮州の街へ、あるいはソウルへと走るのであろうか。ところが、全国的には人口の移動はすでに進んでいて、韓国の農家人口は1960年時点における約80%から現在は16%に減少している。このあたりの山村は、いわば取り残された村なのかも知れない。

#### 緑色革命から環境保全へ

ソウルの南、水原にある農村振興庁の構内に「緑色革命成就」と刻んだ記念塔が立っている。韓国の水稲収量は5.36t/ha(1988年)で、これは、1970年代に生み出された品種「統一」とそれらの子孫によるところが大きい。その時点で、この品種は平均収量を実に34%も上昇させ、この記念塔が立つことになったわけである。水稲に限らず、韓国農業のほとんどの分野で増産が目標に掲げられている。私は、バイオテクノロジーに関しては全くの素人であるが、組織培養とか細胞融合の技術を利用した品種改良や新技術創出の仕事が進められていることを訪問先でよく聞かされた。

目標がはっきりしていると、活気が生まれる。韓国は、今までまさしくそのような状態にあったと思う。日本の支配を離れて後、多くの若い研究者、学者の卵がアメリカをはじめとする外国の大学へ留学し学位を取って帰ってきた。ソウル大学校農科大学の先生の大半は、アメリカなど外国の大学の学位取得者である。農村振興庁の研究所でも外国の大学の学位取得者が目だった。それらの科学者が韓国の食料増産に果たした役割は計り知れないものがあつたであろう。

しかし、増産の目標を追求してきた農学者が、今、環境保全をも取り上げて真剣に考え始めたのである。最初からインターナショナルに目を開いて仕事を展開しようとしている。

そもそも農業は、林業とともに国土を保全しつつわれわれの衣食を保証し、住居を提供し、生活に潤いを与えてくれた。しかし、近年の特に数十年間において、工業と農業の不均衡な成長の結果、農業は工業に侵食され、農業のもつ多面的機能はその発現を妨げられることとなってしまった。

しかし、ここに至って、環境悪化が地球規模で問題にされるようになった。私は横断幕から始まった緊張のなかで、環境と農業の立たされているきびしい状況が、共通の根もっていると思いつけていた。今回のシンポジウムが企画された動機も意義もその辺りにあつたわけである。

自然を守るとは、自然の法則を守ることだと私は思う。農業は昔からそのことを身をもって示してきた。工業に比べると今でも農業はその状態に近い。しかし、いろいろなところで農業さえも環境破壊の原因となっている。農業の本来の姿を確立することは、環境を守ることであり、環境が本当に守れる世の中では農業も立派に成り立つはずだと私は思う。そのような農業においては、伝統的農業の持っていた掟が、螺旋階段の一回り上にあるような関係で発展的に継承されるのではないだろうか。わが国では伝統的農業は、ずいぶん影が薄くなってしまった。韓国では現実に生きている。彼らの方が、螺旋階段を上り易いかもしれない。

わが国のテレビ局があるべき姿を描こうとして、ある局はバリ島の水田地帯で水牛が鋤を引く姿を、ある局はスリランカの農村を写しだしていた。私は、そうだろうか、と疑問を感じたものだが、同時に、わが国の農業研究者がそのアウトラインをも描き出していない現状をはがゆく思った。わが国を本当の衰退国としないために、韓国の研究者の眼差しの輝きを私は学びたいと思う。

## 制限酵素について

寶酒造株式会社 バイオプロダクツ開発センター

小谷博一

### はじめに

バイオテクノロジーの時代ともてはやされるようになって、はや10数年になるが、この間の遺伝子工学、遺伝子操作、DNA組換え実験と言われる分野の進展は、基礎から応用まで目を眩るものがある。この発展を基本づけた1970年代の三大発見、発明としては、制限酵素、形質転換法、塩基配列決定法が挙げられており、この分野の発展に果たした制限酵素の役割の重要性はこのような事からも十分推察することができる。この間に貴重な、また高価な酵素であった制限酵素は、各メーカーより市販される種類、量も多くなり、また安価で入手することも可能になってきている。今では、幾つかの点を除いて制限酵素を使用するのにそれほど注意する事もなく利用できるとごく一般的な試薬となってきている。ここでは、制限酵素についてごく基礎的な事項について述べる。

### 1. 制限酵素 (Restriction endonuclease) の機能

種々の微生物は、自己の遺伝情報の根幹であるDNAを防御する様々な機構を備えている。その内の一つが、制限-修飾酵素系と呼ばれる機構である。即ち、ファージ感染や生物の本来有するDNA取り組み機構によって外来性DNAが、細胞内に取り込まれた場合、そのDNAが、自己のDNAかどうか認識する機構、及びもし取り込まれたDNAが、外来性であればそのDNAを分解する機構が備わっている。この機構を制限-修飾酵素系と

呼んでいる。自己DNAは、DNAメチル化酵素(DNA修飾酵素)による塩基配列特異的にメチル化を受けており、DNAが塩基配列特異的にメチル化を受けているか、否かにより自己、非自己の認識がなされる。また、制限酵素は、非自己DNA、即ち塩基配列特異的なメチル基の存在しないDNAを特定の部位で切断する事により、外来DNAを細胞内より排除する。DNAメチル化酵素と制限酵素の認識する塩基配列は同一であり、DNAメチル化酵素は、自己のDNAメチル化することにより自己の制限酵素による分解を防いでいる。

### 2. 制限酵素の種類と分類

制限酵素は、特定の4~8の塩基配列を認識し、二本鎖DNAを切断するエンドヌクレアーゼであり、表1のように大分類することができる。

歴史的には、I、II、III型の順で発見されており、特にII型酵素はDNA組換え実験に対する有用性のために、1970年代以降精力的にスクリーニングが行われている。現在では細菌、放線菌、藻類などの微生物から認識塩基配列特異性の異なる約150種以上のII型制限酵素が報告されている。実際には、いくつかの異なる微生物から同じ認識特異性をもつ制限酵素が発見されているので、Roberts (Cold Spring Harbor) の最新情報によれば、その種類は約1400種以上にもなる。(制限酵素の一覧表は、Robertsにより毎年 *Nucleic Acids Research* 誌に発表されている。)

遺伝子工学の研究に用いられるのはII型酵素であるので、以下II型制限酵素について述

表1 制限酵素の大分類

大分類	反応に必要な因子	切断点	例
I 型	ATP, SAM, Mg <sup>2+</sup>	認識部位と切断点は異なり 切断部位は一定でない	<i>EcoK, EcoB</i>
II 型	Mg <sup>2+</sup>	認識部位内、又はごく近傍 で特定の部位を切断する	<i>EcoRI, FokI</i>
III 型	ATP, Mg <sup>2+</sup> , SAM*	認識部位の近傍で特定の部 位を切断する	<i>EcoPI</i>

SAM: S-アデノシルメチオニン、\*: 活性を促進するだけという報告もある

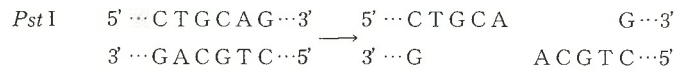
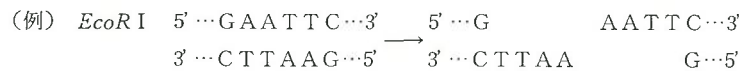
べることにする。

### 3. 制限酵素の切断様式

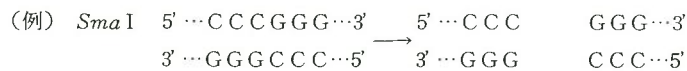
制限酵素はその認識配列の内部、あるいは隣接部位を、5'末端がリン酸、3'末端が水酸基になるようにホスホジエステル結合を加水分解するエンドヌクレアーゼである。この様

#### a. 認識配列内付着末端型 (Cohesive end 型)

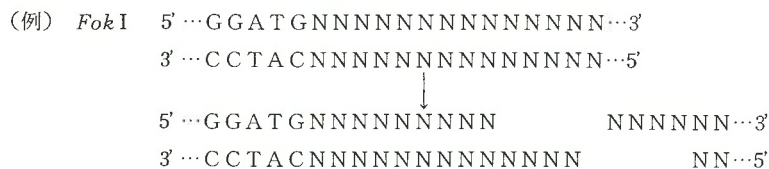
これには5'末端が突出するDNA断片を生成するものと、3'末端が突出するものがある。



#### b. 認識配列内平滑末端型 (Blunt end 型)

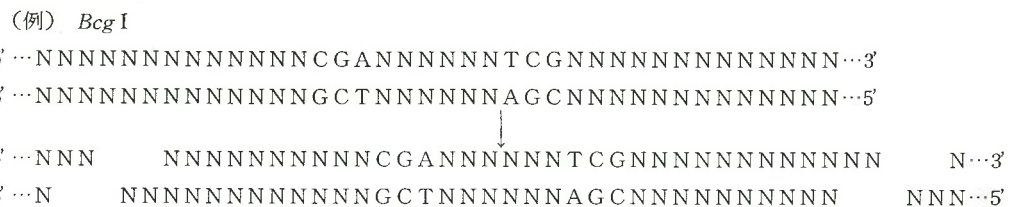


#### c. 認識配列外切断型



#### d. 認識配列外2か所切断型

この型は、1990年に初めて報告されたもので *BcgI* 一種しか知られていない。



に切断されたDNA断片はそのままDNAリガーゼにより再結合することができる。

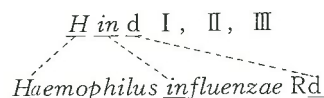
例外として、3'末端がリン酸基になるよう切断する酵素として *NciI* 一種が報告されている。

制限酵素の切断様式は、切断部位の末端形状と、切断部位と認識部位との位置関係により次のように4種に分類することができる。

### 4. 制限酵素の命名法

制限酵素は、その酵素の発見された微生物の属、種、菌株番号などに準じて命名される。例えば、*Haemophilus influenzae* Rd株の産生する3種の制限酵素は、*HindI*, *HindII*, *HindIII*と命名される。この命名の由来

は、以下に示す通りである。



初めのHは、微生物の属名の頭文字1文字、inは、種名の初めの2文字、dは、菌株名を示すRdのdを示している。I、II、IIIで示すローマ数字は、同一菌株内に複数個の制限酵素が存在していることを示している。又、同一属、種内に制限酵素が見いだされていない場合には、Rdに由来するdなどの菌株番号を示す必要はない。

### 5. Isoschizomer

認識塩基配列が同一の酵素を isoschizomer というが、isoschizomer も次のように分類することができる。

a. 認識配列と切断部位の両方が同じもの  
(例) *Taq* I (T↓CGA) と

*Tth* HB8 I (T↓CGA)

b. 認識配列は同一でも切断部位の異なるもの

(例) *Xma* I (C↓CCGGG) と

*Sma* I (CCC↓GGG)

c. メチル化の影響の異なるもの

認識配列が同じでもメチル化酵素のメチル化塩基の異なるものがあり、そのために制限酵素の切断が影響を受ける。その一例を表2に示す。

表2 メチル化DNAに対する特異性

	CCGG	C <sup>m</sup> CGG	<sup>m</sup> CCGG
<i>Hap</i> II	+	-	+
<i>Msp</i> I	+	+	-

+ : 切断する、- : 切断しない <sup>m</sup>C : 5-メチルシトシン

### 6. 制限酵素の使用法

制限酵素を使用する場合に自分で精製して使用される方はまずいと考えるので、ここでは酵素の生産精製については触れず、

使用法について若干触れる。

市販されている制限酵素は、非特異的ヌクレアーゼ、ホスファターゼをまず含まないので、メーカーの出しているカタログや商品に添付しているデータシートに記載されている内容に従えば、問題なく使用できる。特に注意を要するものについては、その旨の記載がなされているので、使用される場合には、カタログ等を十分に読まれることをお勧めする。

注意点の一つは、制限酵素の Star 活性である。本来制限酵素の塩基配列認識は厳密なものであるが、反応液中にグリセロール、DMSO (dimethyl sulfoxide)、エチレングリコールが多量に存在する場合、Mn<sup>2+</sup> 添加や、高 pH 条件下などにより、制限酵素の認識配列特異性が緩み、類似の塩基配列のところでも切断が生じることがある。この活性を Star 活性と呼ぶ。一般的に、制限酵素は50%グリセロールを含む緩衝液で市販されており、大量に制限酵素を用いることは、このような面でも避けたほうがよい。なるべく反応液中のグリセロール濃度は、5%以下にされたほうが無難である。

現在、制限酵素は、酵素に適した緩衝液が添付されて市販されている。この緩衝液は酵素にとって最適のものではなく、通常の反応に使用するのには、とくに問題のない程度のものであると認識していただいたほうがよい。できれば各酵素の最適緩衝液を調製し使用するほうが安心である。

次の問題点は、DNAのメチル化に関する点である。5c)で述べたように、制限酵素の認識配列部位にメチル化塩基が存在する場合には、制限酵素の切断が影響を受けることもある。例えば、大腸菌の場合には、dam, dcmメチラーゼが存在し、それぞれG<sup>m</sup>ATC, C<sup>m</sup>CWGGの配列がメチル化されている(<sup>m</sup>Aは、アデノシンの6位が、<sup>m</sup>Cはシトシンの5位がメチル化されている。Wは、AかTを示す)。このような配列が認識配列内または、近傍にある場合には、メチル化の影響を考慮しなければならない。かなりの制限酵素についてメチル基の影響が調べられているので参考書

(Molecular Cloning, A laboratory manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory press, New York, 1989) を参照されたい。

### 7. 制限酵素の今後

今まで述べてきたように、制限酵素は、今までの遺伝子工学分野の発展に大きな役割を果たしてきた。今後もこの分野の発展に必要なかつ欠くべからざる試薬としてその重要性は、変わらないと考えられる。制限酵素メーカーとしては、今後も新しい、使いやすい酵素の供給を続けていかなければならない。

今までは、4～6塩基認識の制限酵素がよく用いられてきたが、ヒトゲノム解析プロジェクトなどの巨大DNAを解析する研究が盛んになってきており、制限酵素に対する要求

も長鎖認識制限酵素に変わってきている。現在知られている制限酵素のなかで認識配列の最も長いものは、8塩基認識であり、*Not I* (GC↓GGCCGC), *Sfi I* (GGCCN<sub>3</sub>↓N GGCC), *Pac I* (TTAAT↓TAA), *Fse I* (G GCCGG↓CC), *Sse8378 I* (CCTGCA↓GG) 5種が知られているだけである。これからもこのような酵素の開発が続けられるであろう。

一方、制限酵素のみならず、DNAの特異的な部位で任意に切断する方法の開発も進められている。例えば、DNAを切断するブレオマイシンのような薬剤と任意のオリゴヌクレオチドを結合し、目的のDNAを処理することにより任意の部位で切断する試みもなされている。この方法の開発が更に進めば、制限酵素のような認識配列に限定されない二本鎖切断も可能になろう。





#### 編集後記

一般にカイコは狭食性で桑以外の植物をほとんど食べません。蚕糸・昆虫農業技術研究所では、表紙写真に示しましたように桑以外の植物を食べる広食性遺伝子をもったカイコを発見し、実用的な広食性品種を育成しまし

た。このような広食性カイコの育成は、桑以外の植物を原料とする低コスト人工飼料製造技術の開発とあいまって革新的な養蚕技術の確立と、カイコの新しい利用領域の開拓に寄与するものと期待されています。

(大畑記)

#### ブレイン テクノニュース (第25号)

平成3年5月15日発行

発行者 佐野宏哉

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

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

編集 (社)農林水産技術情報協会

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