



農業試験研究一世紀記念



表紙説明

核移植により生産された子牛

このうちのホルスタイン雌(左から2番目)は、わが国で初めて種雌牛として血統登録された。

(本文 6 ページ参照)

本号の紙面

国内情報..... |
 畜産とバイオテクノロジー、胚移植、核移植によるクローンウシの作出、形質転換ニワトリの作出、ヒト疾患トランスジェニックマウスモデル、遺伝子組換えによる鶏用ワクチンの開発、遺伝子分析による検査および診断、産業動物のゲノム解析、畜産とバイオテクノロジー関係既掲載情報
 文献情報.....27
 擬似花を作る植物病原菌、非水溶液系における酵素反応
 海外便り.....30
 英国植物科学研究所での一年
 お知らせ.....32

口 絵

国内情報

小宮山鐵朗

畜産とバイオテクノロジー——特集にあたって——…………… 1

塩谷康生

胚移植——その利用と問題点——…………… 2

河野友宏

核移植によるクローンウシ作出の現状…………… 6

桜井通陽

受精卵へのDNA微量注入による形質転換ニワトリの作出…………… 9

山村研一

ヒト疾患トランスジェニックマウスモデル…………… 11

柳田 昇

遺伝子組換えによる鶏用ワクチンの開発…………… 14

加藤 篤

遺伝子分析による検査および診断…………… 17

向山明孝

産業動物のゲノム解析——特に家畜の個体識別を目的としたゲノム解析——…………… 21

畜産とバイオテクノロジー関係の既掲載情報についてのご案内…………… 26

文献情報

擬似花を作る植物病原菌…………… 27

非水溶液系における酵素反応…………… 28

海外便り

矢野昌裕

英国植物科学研究所での一年…………… 30

お知らせ

生研報告のご案内…………… 32

胚移植——その利用と問題点 (本文 2 ページ)



酪農家での胚移植風景 (栃木県那須町で)



体外成熟卵子を用いた体外受精技術によって生産された子牛

受精卵へのDNA微量注入による形質転換ニワトリの作出 (本文 9 ページ)



ガラスびんの中のニワトリ受精卵にDNAを微量注入しているところ

国内情報

畜産とバイオテクノロジー

——特集にあたって——

農林水産省 畜産試験場

小宮山鐵朗

1. はじめに

わが国の畜産は、仏教伝来以後、軍事目的の馬以外は産業としての発展は見られず、耕種農業における役利用・堆肥利用としての役割が中心であり、明治の文明開化になって、初めて西洋型畜産の導入が試みられたという極めて特異な発展形態を持っている。

わが国の国土が狭いことから、広い土地を有し飼料を自給しうる畜産農家は少なく、輸入した飼料の購入に頼るものが多く、自然循環がうまく行かないため畜産排棄物問題を増大させている。さらに、外国からの畜産物の輸入増加、生産の担い手となる若年労働力の不足等々、内外の問題が山積している。

このような厳しい状況を打破し、明るい展望の持てる畜産業を発展させるためには、新しい技術の開発が強く要望されている。

革新技術として、最も期待されているのがバイオテクノロジーである。

2. 畜産におけるバイオテクノロジー

バイオテクノロジーを、「生物に関する技術または技術学」という意味にとらえると、畜産に関する従来から蓄積された伝統的技術もまさしくバイオテクノロジーといえようが、近年の「生物工学」というとらえ方をすると、本特集に掲載されている技術及び情報が、畜産におけるバイオテクノロジーの中心と考えられる。

これらに加えて畜産業に大きな影響を与える技術を若干追加すると、性支配、乳酸菌等の細胞融合による新製品の開発、遺伝子組換えによる生理活性物質等の有用物質の生産、臓器移植用動物の開発などがあげられる。

革新技術のそれぞれは、畜産業に大きなインパクトを与えるものであるが、いずれにしても、伝統的畜産技術と組合せて実効があがるものが多い。したがって、革新技術の発展は勿論重要であるが、伝統的技術の発展もあわせて必要で、両者を組合せたものが畜産の新技術といえよう。

3. パブリック・アクセプタンス

バイオテクノロジーの多くは、生命の本質にかかわる現象に、人為的な操作を加えるもので、その価値判断は単に自然科学の面からのみでなく、倫理、哲学、宗教等の面からも判断されなければならないもので、いわゆるバイオエシックスに対する配慮が必要となる。

また、最近、動物愛護や動物福祉（アニマル・ウェルフェア）の面からも、研究者の倫理が要求されている。

したがって、バイオテクノロジー研究に際しては、以上のことに充分配慮して、パブリック・アクセプタンスが得られるものとしなければならない。

4. 畜産技術としての評価

バイオテクノロジーは、ライフサイエンス上からの評価だけでは、必ずしも充分ではない。革新技術の畜産業へ与える経済的・社会的メリット・デメリットを配慮したうえで、

普及を図るべきである。往々にして、新技術は物質生産効率を高めるが、小規模農家は技術導入におくれをとり、結果として小規模農家の減少を招くことがある。

5. おわりに

冒頭に述べたように、国土が狭いわが国の

畜産業が、外国のそれと競合して存続して行くためには、新しい生物資源の開発や生物機能の増大をもたらすバイオテクノロジー研究は非常に重要である。

上述した点を配慮しながら、早急な研究開発が望まれる。

国内情報

胚移植——その利用と問題点——

農林水産省 畜産試験場繁殖部

塩谷康生

1. はじめに

畜産において胚移植技術はSPF(清浄)豚群への新しい系統導入や特定の乳用山羊増殖などに応用されているが、広く用いられているのは牛においてである。農水省調査では平成3年度牛受精卵移植実施機関は276機関で、26000頭以上の移植がなされている。この移植頭数は5年前の昭和61年の4倍に近い数になっている。

胚移植(受精卵移植)を構成する技術には、胚の生産に関わる過排卵処理、胚の採取と体外での操作、胚を移植されることになる受卵牛の発情調整と移植がある。現在の非手術的採卵法でも100%(?)近い採取率であり、非手術的移植によって50%以上の受胎率を得ることは困難でなく、胚の採取手法や移植技術それ自体の完成度は高い。現在研究の進展が著しいのは胚の体外での操作であり、それには胚の培養、胚の凍結保存、一卵性双仔作出のための胚の切断分離、あるいは性判定、さらに一個の胚の割球を核移植することにより胚を多数複製するクローン技術などがある。

これらの技術は別にして現時点で胚移植の

最大の問題点は過排卵処理にあるといえる。すなわち1頭のドナーから1年間で50頭以上の産子を得た報告¹⁾もあるが、多排卵を伴う胚移植(MOET)研究の中で古川²⁾は37頭のドナーの平均産子数は3.5頭であり、産子数が6頭以上のドナーは全体の22%であったと報告している。これらの数値は過排卵処理のみが要因であったわけではないが、多くの産子を得るためにはまず多くの移植可能胚を得ることが必要であり、そのためにはいかに多くの卵胞を一度に発育させ、排卵させるかが胚移植の出発点になる。その意味で胚移植における過排卵処理の重要性がよく理解できる。ここでは胚移植そのものよりも胚の生産の問題点について過排卵処理や体外受精を中心として記述する(口絵参照)。

2. 過排卵処理

過排卵処理は性腺刺激ホルモンの投与によって行われるが、下垂体性卵胞刺激ホルモン(FSH)あるいは妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG)を用いようが、①牛個体により反応の変動が大きく反応の次前予測が難しく、②繰返し過排卵処理を行うことによる反応の低下がある。①については1ないし2回過排卵処理を行い、その結果によってドナーとして

SHIOYA Yasuo

用いることも行われているが、特定の優良な個体を過排卵処理することによって確実に胚が採取できる保証はない。FSH の場合、豚や馬などの下垂体由来かあるいは閉経婦人尿由来³⁾あるいは遺伝子操作による大腸菌由来⁴⁾のものといろいろあり、反応の変動の幅は用いるホルモンによっては小さくなってきているが、基本的な問題は解決されていない。②については十数回繰り返しても、反応の低下がみられず、多くの移植可能胚が採取できる個体も存在する⁵⁾が、多くの牛では処理を繰り返すことによって移植可能胚数が減少する。反応が低下した場合同種のホルモンを投与するのではなく、FSH と PMSG を交互に用いることや、ドナーを妊娠させることも行われているが、必ずしも成功するとはいえない。発情周期ごとに種付けして採卵を行う1卵採取も行われており、受胎性は良好である⁶⁾が、非効率である。しかし胚移植においてはある一定期間内に何頭の子牛を生産できるかが重要であることを考えると、実行する価値は高い。

ドナー及びレシーピエントの発情調整に黄体退化作用のある PGF2 α の出現が大きな影響を及ぼしたように、繁殖技術向上には生体における調節機構物質の解明が重要な役割を果たしている。その点で卵胞刺激ホルモンの分泌を抑制することによって卵子生産に関わっているインヒビンをを用いて免疫させた牛では、下垂体性からの FSH の分泌抑制が解除され、排卵数が増加する⁷⁾ことも知られており、また PMSG による過排卵処理前に成長ホルモンを投与することによって、排卵数が2倍に増加することも報告⁸⁾されている。今後過排卵処理法は卵胞発育機構の解明とともに改善されていく必要がある。

事前に反応を予測する点では栄養などの面からも研究されているが、過排卵処理に先立って卵巣表面にある卵胞を超音波によって検査し、反応を予測する試み⁹⁾も行われている。一方において過排卵処理にともなう問題の最終的な解決法としては1個の胚を16個あるいは二代目に $16 \times 16 = 256$ 個、三代目に 4096個

のように複製できる核移植と継代核移植(三代目の胚からも子牛が生産されている)の技術開発¹⁰⁾が待たれているが、現時点でいくつかの新しい技術が胚の大量供給の観点から注目されている。

3. 牛の体外受精

安価に大量に胚を生産する技術として、食肉処理場を利用した体外成熟 (IVM) 卵子による体外受精 (IVF) は、1992年5月家畜改良増殖法の改正を受け現在広く行えるようになった。平成3年度移植実績で4000頭以上、受胎率37%、生産頭数1000頭以上の数字に示されるように、1985年 IVM/IVF による子牛生産に成功¹¹⁾して以来7年で実用的普及にまで進展したことになる。体外成熟、体外受精、体外培養 (IVC) については材料入手の容易さから急速に研究が進んでおり、これらの成果が牛胚凍結などの他の分野の研究にも生かされている。現在、採取した卵子の10~30%が移植可能な胚盤胞にまで発生し、移植後に比較的高い受胎率が得られている¹²⁾しかし1頭あたりではまだ数個であり、卵子採取法の効率化とともに採取できた卵子すべてを移植可能な胚盤胞に発生させ得るような IVM/IVF/IVC 技術が望まれている。

この技術は食肉処理場で枝肉形質が判定された優良雌牛の死後利用法として肉用和牛の増産技術として活用されてきている。育種利用のためには、より多くの産子が得られるようになり、産肉形質データの整備がなされなければならない。それだけではなく未成熟卵子や受精初期胚は遺伝子導入子牛生産や核移植研究には欠くことができず、その重要性は高まってきている。

4. 生体からの未成熟卵子の採取

食肉処理場で得られる卵巣を利用する IVM/IVF はその個体にとっては最終的な方法であり、同一個体については二度と繰り返すことができない。この技術を生体の牛に適用

する方法が行われている。内視鏡を用いる採卵法は子牛においても数回繰り返すことが可能であり¹³⁾、膣壁を穿孔する方法は腹壁穿孔よりも手術的侵襲が少ないが、繰り返すことにより癒着や感染などの危険性が高まる。その点に関して、超音波画像診断技術と組合せて、経膣的に生体の牛から未成熟卵子を採取することが行われている¹⁴⁾。この方法によればホルモンを投与する必要もなく、定期的に採卵を繰り返すことができ、1年間では大量の未成熟卵子が採取できる。卵巣が下垂しない時期の妊娠初期の牛においてホルモン処理も卵子採取も可能である¹⁵⁾ので、この技術の応用範囲は大きい。

比較的短期間に大量に得られる未受精卵は数頭の優良な雄牛精液を要因分析的に計画交配することができ、その意味で多排卵を必要としない新しいMOETとなりうる。

5. 原始卵胞中の卵子の利用

多くの哺乳動物において基本的に卵子（第一次卵母細胞）は胎生期から出生直後頃までに数の増加を終了し、第1減数分裂の前期まで進んでいる。このような卵子の数は牛の出生時に数万個存在している。しかしこのままではまだ卵子として成長が進んでおらず、周囲に卵胞が形成されることにより成長し、成熟能力を有するようになる。マウスにおいてこのような発育途上の卵子を体外で発育させ、卵細胞質が十分に発育した時点で減数分裂を再開させることにより、成熟卵を得、体外受精することによって産子の生産が報告されている¹⁶⁾。この成功率はまだ低率であるが、豚卵子についても研究されている¹⁷⁾。生体内の卵胞内で起きている減数分裂の再開を抑制しつつ、卵子を成長させる現象を体外で再現させるためには多くの解き明かさねばならない問題が残っている。しかし、このような技術は、将来大量に未受精卵を必要とする核移植の発展的展開のためにも利用されるであろう。

原始卵胞の培養に関連し、牛胎仔卵巣から

卵子を採取し、体外で成長させ、体外で受精させ、さらにそれを移植して胎仔を作り、その卵巣を再び利用することを繰り返すことによって、世代間隔を短縮し改良を進める方法も提起されている¹⁸⁾。しかしこの方法は仮説段階であり、倫理的な面だけでなく、技術的に克服すべき問題が多く残されている。

6. 性判別

胚の一部を顕微鏡下で取り出し、数個（理論的には1個）の細胞のDNAを分析することにより、胚の雌雄を判別する技術が開発されており¹⁹⁾、望む性の産子を得る技術は確立されつつある。この技術は普及性が高いと考えられるが、望まない性の胚を捨て去るという欠点がある。その点では卵子の有効利用の観点で待望されているのが、X、Y精子分離による生み分けである。フローサイトメーターを用いたX、Y精子の分離法では精子数が少なかったり、活力がなくなったりすることもある²⁰⁾ので、通常的人工授精には用いにくいとされている。これらの精子の利用法として体外受精が行われている。分離した精子を従来のIVFに用いることによって性が予知された子牛が生産されている²¹⁾。透明帯に切開孔をつくることによって牛精子の透明帯通過を容易にするPZD法によって受精卵を得て、子牛を生産できたことも報道された（福井県畜試、1993）。これ以外にも運動性を全く消失させた精子を顕微鏡下で囲卵腔内に注入することによっても子牛が生産されている²²⁾。このような方法がより効率よく再現性の高い技術に発展していくことが望まれている。それによってX、Y精子を完全に分離するために、精子の尾部の存在や運動性を考慮せずに操作し、これらを顕微受精に用い、卵子の有効利用を行うことも考えられる。

7. おわりに

日本では胚移植関連の研究が大々的に行われており、精製したFSHによる過排卵処理

やホルモン投与方法, 胚の凍結あるいは体外受精およびその後の胚の培養法, 核移植に大いなる成果が上がっている。これらは農林水産研究文献解題No.18, 動物バイオテクノロジー編(農林水産技術会議事務局編, 1992)に解説されているが, ここでは十分には触れることができなかった。

引用文献(胚移植, 利用と問題点)

- 1) Seidel, G.E. Jr. (1980) *Guernsey Breeders' J.* 146 : 16-18
- 2) 古川力 (1993) 東日本ET研報 9 : 29-44
- 3) Murphy, B.D., Mapletoft, R.J., Manns, J. and Humphrey, W.D. (1984) *Theriogenology* 21 : 117-125
- 4) Looney, C.R., Bondioli, K.R., Hill, K.G. and Massey, J.M (1988) *Theriogenology* 29 : 271
- 5) Hasler, J.F., McCauley, A.D., Schermerhorn, E.C. and Foote, R.H. (1983) *Theriogenology* 19 : 83-99
- 6) 永田建一 (1990) 7回九州沖縄地区家畜人工妊娠技術検討会資料
- 7) Scanlon, A.R., Sunderland, S.J., Martin, T.L., Goulding, D.G., O'Callaghan, D., Williams, D.H., Headon, D.R., Boland, M.P., Ireland, J.J. and Roche, J.F. (1993) *J. Reprod. Fert.* 97 : 213-222
- 8) Gong, J.G., Wilmut, I., Bramley, T.A. and Webb, R. (1992) *Proc. 12th Inter. Congr. Anim. Reprod.* 1 : 214-216
- 9) 鈴木修・居在家義昭・島田和宏・荒木玄朗・小杉山基明 (1988) *中国農研報* 2 : 21-33
- 10) Willadsen, S.M. (1989) *Genome* 31 : 956-962
- 11) 花田章・塩谷康生・鈴木達行 (1986) 78回日本畜産学会講要
- 12) 塩谷康生 (1992) *畜産の研究* 46 : 455-458
- 13) Armstrong, D.J., Holm, P., Irvine, B., Petersen, B.A., Stubbings, R.B., McLean, D., Stevens, G. and Seamark, R.F. (1992) *Theriogenology* 38 : 667-678
- 14) Pieterse, M.C., Vos, P.L.A.M., Kruij Th. A.M., Wurth, Y.A. van Beneden, Th, H., Willemsse, A.H. and Taverne, M.A.M. (1991) *Theriogenology* 35 : 19-24
- 15) Ryan, D.P., Blackwood, E.G., Swanson, W.F., Rodrigues, H. and Godke, R.A. (1990) *Theriogenology* 33 : 315
- 16) Eppig, J.J. and Schroeder, A.C. (1989) *Biol. Reprod.* 41 : 268-276
- 17) Hirao, Y., Miyano, T. and Kato, S. (1992) *Proc. 12th Inter. Congr. Anim. Reprod.* 1 : 333-335
- 18) Betteridge, K.J., Smith, C., Stubbings, R. B., Xu, K.P. and King, W.A. (1989) *J. Reprod. Fert. Suppl.* 38 : 87-98
- 19) 渡辺伸也・高橋清也・小西秀彦・今井裕・粟田崇・高橋秀彰・榎田博司・安江博 (1992) *日本畜産学会会報* 63 : 715-720
- 20) Johnson, L.A., Flook, J.P. and Hawk, H. W. (1989) *Biol. Reprod.* 41 : 199-203
- 21) Cran, D.G., Johnson, L.A., Miller, N.G.A., Cochrane, D. and Polge, C. (1993) *Vet. Rec.* 132 : 40-41
- 22) Goto, K., Kinoshita, A., Takuma, Y. and Ogawa, K. (1990) *Theriogenology* 33 : 238

国内情報

核移植によるクローンウシ作出の現状

東京農業大学総合研究所
河野友宏

核移植は、クローン動物（遺伝的に同一形質を持つ個体の集団）を作出するためのすぐれた技術であり、胚分割などの手法に比べはるかに大きな可能性を秘めている。その原理は、発生の進んだ核を成熟卵子に移植し、その遺伝情報を再プログラムして受精時あるいはそれに近い状態に戻すことによって、再構築卵に個体への発生活力を獲得させようとするものである。哺乳動物における核移植の基本的技術は、1983年 McGrath and Solter により開発され前核置換法に基づいている。1986年には、Willadsen がヒツジにおいて8～16細胞期胚の割球を未受精卵に移植する方法で産子の生産に成功し、未受精卵への核移植がドナー核の再プログラムに適していることが明らかにされた。翌年、ウシにおいてWilladsenの核移植法により産子の生産に成功したことがウイコンシン大のFirstらのグループから報告された。畜産への影響が最も大きいウシにおける研究は、ここ数年の間に飛躍的な成果を遂げている。

1. 核移植によるクローン動物の作出法

家畜におけるクローン作出のための核移植法は、Willadsen (1986) が開発した第2成熟分裂中期卵（排卵卵子）への核移植法に準じており、細胞融合にはKubiak and Talkowski (1985) の電気的細胞融合法が使用されている。現在実施されている核移植方法を要約すると、次のようである。レシピエント卵には、食肉市場より入手し卵巣から卵核胞期卵

を採取し体外で成熟培養した後、マイクロマニピュレーションにより染色体を除去した除核未受精卵を、またドナー核としては、生体由来の16～64細胞期胚の割球がそれぞれ使用されている。細胞融合は、電解質液に微量の Ca^{2+} および Mg^{2+} を含めた溶液を満たした平行電極チャパー内に操作胚を入れ、交流電流により操作胚の向きを誘導した後、1ないし2回の直流電流を通電している。核移植卵の胚盤胞への培養は、体外培養法に比べヒツジ卵管内での生体内培養法が優れているとされ、核移植卵は寒天にて包埋したのち一旦ヒツジ卵管内に移植して5～6日間生体内培養し桑実胚あるいは胚盤胞に発生させ、これを回収して授卵牛に移植する方法が採られていた。しかし、最近では、グルタミンを添加した新しい培養液や卵管粘膜細胞などとの共培養系の開発といった体外培養系の改善により、核移植卵も体外培養により生体内培養に匹敵する率で胚盤胞へ発生させることが可能となってきた。特に、我が国ではヒツジの使用は事実上困難であることから、優れた体外培養系の使用が不可欠である。

2. レシピエント卵細胞質のステージの影響

海外では、レシピエント卵には生体由来の排卵卵子を回収し、核移植に使用されていた。最近では、卵巣の卵胞卵子を体外培養して成熟させた第二成熟分裂中期の卵子が十分核移植に使用可能であることが示されている。体外成熟卵子は、当初成熟分裂が完了したのち数時間以内（成熟培養22～24時間程度）のも

KONO Tomohiro

のが使用されていたが、核移植卵の発生は低率であった。その後、成熟時間の延長に伴い発生率が向上することが判明し、現在では成熟培養40～42時間目の過齢卵子がレシピエント卵として使用されている。ただし、未受精卵から高率に除核するためには、成熟培養22～24時間目に除核操作を行うことが必要で、除核卵をさらに培養して核移植に用いられている。

また、最近筆者等は、除核未受精卵への核移植により、核移植卵の発生率が向上するとともに安定した成績が得られることを示した。この方法では、除核未受精卵に対して電気刺激による単為発生処理を施した後、6～9時間目にドナー割球を融合させた。体外培養の結果、核移植卵の約30%が胚盤胞に発生し、移植試験により産子の生産に成功した(表紙写真)。この場合、核移植時のレシピエント卵は早期前核期に相当し、卵細胞質の成熟促進因子(MPF; Maturation Promoting Factor)活性はすでに低下している。したがって、成熟卵子や過齢卵子への核移植に認められるドナー核の早期染色体凝縮は全く認められないこと、また引き続いて生じる核の膨化も限られていることが知られている。

ドナー核が再プログラムされる機構については不明な点も多いが、レシピエント卵と融合した間期にあるドナー核は、融膜が崩壊し、染色質が凝縮する早期染色体凝縮を示した後、核が再構築され、次いで著しい膨化を呈する変化が認められる。この一連の核の再構築の過程において卵細胞質因子によりドナー核の再プログラムが達成されるものと考えられている。しかし、活性化未受精卵への核移植で

は、上述のようなドナー核の変化は認められず、何時どのようにドナー核が再プログラムされるのかについては明らかでない。

3. ドナー核の発生ステージおよび細胞周期の影響

核移植により産子を作出できるドナー核の発生ステージは限られた範囲であると考えられていたが、最近の研究成果はこのような考えを見事に覆した(表1)。Wildasen (1986)によるヒツジ、ウイスコンシン大学の Firstら(1987)によるウシでの成功は、いずれも8～16細胞期胚をドナー胚として使用したものであった。その後、ドナー胚の発生ステージは16～32細胞期そしてさらに32～64細胞期へと進み、産子の作出に成功した。ヒツジでは、胚盤胞内部細胞塊細胞から産子の作出に成功(死産)したことが報告され、核移によるクローン家畜の生産の可能性が大きく広がった。さらに、本年の国際胚移植学会において Smis and First は、ウシにおいて継代培養された胚盤胞内部細胞塊細胞(胚性幹細胞様細胞)を核移植に用い、産子の生産に成功したことを報告し、周囲を驚かせた。胚性幹細胞(Embryonic Stem Cell)は、胚盤胞内部細胞塊細胞から分化した細胞で極めて高い多分化能を有している。キメラ動物において生殖細胞系列を含む多様な細胞・組織・器官に分化できることから、既に胚性幹細胞が樹立されるマウスでは遺伝子導入動物の作出に利用されている。彼らの使用した細胞は、胚性幹細胞であるとは言えないまでも、継代培養された細胞から産子の生産に成功した意義は

表1 核移植による産子の生産とドナー核のステージ

動物種	ドナー胚ステージ					
	2-細胞	4-細胞	8～16細胞	32細胞	64細胞	I C M E S 様細胞
ウシ			産子	産子	産子	産子
ヒツジ			産子	産子		産子
ヤギ				産子		
ブタ		産子				
ウサギ			産子			
マウス	産子	産子	産子			

極めて大きい。今後、多分化能を有する継代可能な細胞あるいは体細胞の核移植への利用が図られると考えられる。

一方、ドナー核の細胞周期が核移植卵の発生能を支配する重要な要因であることが指摘されている。すなわち、ドナー核の細胞周期は、再構築が正常な2倍体の核を再構築し、かつDNAの複製を行うか否かを定める重要な要因であることを意味している。レシピエント卵の状況とも密接に関連しているが、現在のところ、G1期～S期にかけてのドナー核を用いた場合、高い発生能を有する核移植卵が得られるとされている。そこで、種々の細胞同調試薬によりドナー核の細胞周期を同調させる試みが行われているが、現在のところ有効な方法は確立されていない。

4. 核移植の継代

核移植を連続して行う継代核移植により、クローン胚の生産数を増大させようとする試みもなされている。すなわち、16細胞期の胚をドナー胚として初代の核移植を行い、この核移植胚が16細胞期に発生したときに、これをドナー胚として再び核移植を実施するものである。このような方法により、1～3回核移植を継代しても発生率には、世代間で大差のないこと、また、産子への発生能も保持されていることがすでに明らかにされている。Bondioliらによれば、6回の核移植の継代を行った結果、一つのドナー胚から190個もの胚の複製に成功したとしている。継代核移植

は、クローンの数を拡大する有効な手段として期待される。

5. 日本における研究の進展状況

1989年千葉県畜産センターの牛島と農林水産省畜産試験場の角田らの共同研究により、核移植胚由来の胚盤胞を移植したレシピエントの妊娠が成立したことが報じられたが、その後わが国ではしばらく核移植によるウシの生産は成功しなかった。1992年末から本年始めにかけて、我々は双子を含む7頭の産子を核移植胚から生産することに成功した。また、ほぼ同時期に、雪印受精卵研究所と近畿大学で相次いで核移植による産子の生産に成功している。本年は、さらに多数の核移植による子牛の出産が予定されている。未だ核移植の技術自体や受卵牛の確保など多くの問題が残されているが、ウシのクローニングが実用的な技術として確立するために研究の一層の活性化と進展しが望まれる。

参 考 文 献

1. Willadsen, S.M., (1989) *Genome* 31: 956-962
2. First, N.L. and Prather, R.S., (1991) *Differentiation* 48: 1-8
3. 河野友宏 (1991) 畜産の研究 45: 205-210
4. 角田幸雄 (1992) 日本畜産学会報 63: 192-200

国内情報

受精卵へのDNA微量注入による形質転換 ニワトリの作出

農林水産省 家畜衛生試験場 分子免疫研究室
桜井通陽

1. はじめに

1980, '81年にマウス受精卵へのDNA導入が相次いで報告されて以来, これまでにマウス以外にもウシ・ブタ等の家畜, さらにカエル・魚に至る多くの動物種での形質転換動物の作出が報告されている。それらにおいて作出法として広く用いられているのは, 受精直後の受精卵に極めて細いガラス針を刺してDNAを微量注入(マイクロインジェクション)する方法である(本誌第33号の表紙はウシ受精卵への微量注入の写真で飾られているので参照されたい)。マウスを例にとれば, その手順としては, ①マウス卵管からの受精卵採取, ②卵の雄性前核中へのDNA注入, ③受精卵の体外培養(1日), ④擬妊娠マウス卵管への卵の移植, ⑤注入されたDNAを保持する産仔の検出, ⑥注入されたDNAの子孫への伝達の確認, の各操作がある。マウス以外の動物種についてもこの基本形がそれぞれの受精卵の性状・形態に応じて改変され用いられている。たとえばウシ受精卵の場合, 微量注入前に軽く遠心し細胞顆粒を一隅に寄せることによって雄性前核が顕微鏡下で見えるようにする必要がある。またカエル・魚では多くの場合細胞内の核が見えないのでDNAは受精卵の細胞質中に注入される。その場合, 注入されたDNAの染色体への組み込み効率は核内に注入された場合に比べ低くなる。

一方, 微量注入法とは原理的に異なった方法として, 初期胚由来の胚性幹細胞(ES細胞)

を経由して形質転換マウスを作出する方法がある。この方法の画期的な点は, マウスがもともと持っている特定の遺伝子を欠損させた形質転換マウスを作成できる点である。しかしこの方法は現在のところマウスについてのみ可能である。ウシ・ブタ等についても試みられているが未だ成功例は報告されていない。この二つの報告およびそれによって得られた成果については, すでに本誌によってもたびたび紹介され, また多くの総説・実験書もあるのでそれらを参照していただくことにして, つぎには, 我々が現在農林水産省畜産試験場育種資源研究室と共同で行っている, 形質転換ニワトリ作出法の開発について紹介したい。

2. 微量注入法による形質転換ニワトリ作出

ニワトリは経済動物の一つであり発生学研究的の好個の対象である。それにもかかわらず, これまでに微量注入法による形質転換個体作出の例はなかった(後にも触れるが, レトロウイルスベクター法による作出例はすでに報告されている)。その最大の問題は, 受精直後のニワトリ胚を操作したのち, これをヒヨコにまで育てることができなかった点である。しかし, 1988年にPerry¹⁾によって受精直後(1細胞期)のニワトリ胚をヒヨコにまで人工的に培養する方法が開発された。それは, はじめの24時間は受精卵を培養液の入ったガラスビン内で, その後は卵殻内に移して培養するというものである。その後この方法は畜産試験場育種資源研究室の内藤充博士らによ

って改良され、現在では1細胞期の受精卵からのふ化率が30%程度にまで高められている^{2,3)}。この技術の開発によって微量注入法による形質転換ニワトリ作出への道が開かれたといえよう。

我々が実際に行っている実験の流れは以下のとおりである。①産卵鶏の卵管から受精卵を採取し、②これをガラスピンに移した後、ガラス針を用いてDNAを微量注入し、③次いで、内藤らの体外培養法で培養してヒヨコをふ化させ、④得られたニワトリ個体から染色体DNAを抽出し、その中に微量注入されたDNAが存在するかをサザンハイブリダイゼーション法で検討する。このうち、微量注入については若干解説が必要と思われる。この時期のニワトリ胚細胞質は極めて扁平であり、ガラス針の先端が胚の核内あるいは細胞質内にある状態を確認することはできない。そこで実際の微量注入操作では、胚に対してほぼ垂直に立てたガラス針を実体顕微鏡下で胚に向かってゆっくり前進させ、針の先端が胚を通過した後に今度はそれを引き抜く。その間ガラス針の先端から一定の流量でDNA溶液を流出させておく。この操作によってニワトリ胚細胞質内に効率よくDNAを注入できることは内藤ら^{4,5)}によって報告されている(口絵参照)。

初めに行った実験では、注入DNAとしてはニワトリβ-アクチンプロモータと大腸菌*lacZ*遺伝子が接続されたプラスミド(pAcZ)を用いた。実験では計263個の受精卵にDNAを微量注入し、そのうち血液採取できるまでに育った個体数は26であった。その中で1羽のオス(W-9266)の血球DNA中にpAcZが検出された。また得られたオス(19羽)の精子DNAを抽出し調べたところ、別の1羽(W-9273)でpAcZが検出された。この2羽からのDNA抽出・注入DNA検出はふ化後数か月から1年半にわたって計4回行ったが、すべてにおいてW-9266では血球DNAに、W-9273では精子DNAにpAcZが検出された。このことからこの2羽において、pAcZが染色体DNAに組み込まれていることが推

測された。また検出されたDNAのバンド強度から、W-9266では2倍体細胞あたり0.07~0.02コピー、W-9273では0.02~0.015コピーのpAcZが存在することがわかった。この値はこれらの個体の血球細胞および精子のうちでもpAcZを保持した細胞の割合が低いことを示すものである。さらに、数種の制限酵素を用いた実験結果から、これら2羽のニワトリ中のpAcZに構造上の大きな変化はないこと、また、pAcZは7コピー以上が互いに連結した状態で染色体に組み込まれていることが推測された。これら2羽のニワトリから、その子供への注入DNAの伝達を見るため、これまでに計700羽あまりの子供をとり、調べたが、pAcZを持った子供は得られなかった。

以上の研究結果は、微量注入法により、外来DNAを保持したニワトリ個体を得ることに成功した世界初の例である。今回の実験において、注入されたDNAを持った子孫が得られていないのは、精子中にpAcZが検出された個体(W-9273)においても、そのコピー数から予測されるように、pAcZを保持した精子の割合が極めて低かったことによるものと考えられる。今回と同様のやり方でニワトリ胚へDNAを微量注入し、その取り込みをふ卵4日の時点で調べた実験^{4,5)}の結果は、注入されたDNAを保持する細胞の割合には胚ごとに大きなばらつきがあり、なかには胚を構成する細胞のほぼすべてがDNAを保持している場合もあることを示している。今回DNAが検出された2羽の個体の場合は注入されたDNAを保持した細胞の割合が低く、血液幹細胞や幹精原細胞(stem spermatogonium)の一部にのみDNAが保持されていたものと推測される。したがって今回の結果によって、あとはさらに実験数を積み重ねることにより形質転換ニワトリの系統を作出できる見通しがついたと考えている。我々は現在さらに微量注入実験を続行中である。

3. おわりに

現在、畜産分野での応用をめざして各種の

形質転換家畜の開発研究が世界各国で行われている。それが将来どのような形で実用化されるとしても、そのためには純粋に技術的な問題以外に安全性やそれが一般社会に受け入れられるか（いわゆる、パブリックアクセプタンス）の問題などクリアすべき課題が多い。例えば、ニワトリについていえば、これまでもレトロウイルスベクターを用いて形質転換ニワトリを作出した例がある。しかし、仮に、このようなニワトリの実用化を考えた場合、レトロウイルスがもともと発ガンウイルスであることから、科学的な議論だけではそれが安全なものであることを納得してもらうには多大な困難が予想される。また、牛や豚などの形質転換家畜の開発には多大なコストがかかり、それをどうやって回収できるかも大きな課題である。したがって、実用化の当面の目標としては、医療上有用であり、かつ効力を持つためには高等動物内で生産されることが必要なタンパク質を形質転換動物で生産・分泌させることが考えられているよう

である。我々は形質転換ニワトリを発生学研究や免疫学研究のための実験系として役立てることを念頭において現在の研究を行っている。しかし、形質転換家畜の実用化に際しての諸課題・動向を考慮したうえで、個体群維持の経費が牛・豚に比べれば格段に安い点や、卵白に外来性タンパク質を分泌させる点などのニワトリの特徴を考え合わせると、微量注入法による形質転換ニワトリが、将来なんらかの用途で実用化される形質転換家畜・家禽として最有力候補の一つとなりうるのではないかとの印象も持っている。

文 献

- 1) Perry, M. et al. (1988) *Nature* 331 : 70-72
- 2) Naito, M. et al. (1990) *J. Exp. Zool.* 254 : 322-326
- 3) 内藤充 (1991) 細胞工学 10 : 501-506
- 4) Naito, M. et al. (1991) *Int. J. Dev. Biol.* 35 : 69-75
- 5) 阿形清和ら (1991) 細胞工学 10 : 507-512

国内情報

ヒト疾患トランスジェニックマウスモデル

熊本大学医学部遺伝発生医学研究施設
山村研一

1. はじめに

マウスの受精卵や初期胚に対する操作技術は実験発生学における一つの技術として発展した。マウスは成体でも体重30gと小さく、また性成熟に要する期間も生後7～8週であることから実験動物としては早くから注目され系統化が試みられていた。これを背景として、1950年代になり受精卵や初期胚の採取技術、その培養技術、仮親の卵管や子宮への移

入技術が開発された。この技術を基盤として、受精卵や初期胚に対する操作技術が開発されていく。トランスジェニックマウス (transgenic mouse) 作製技術は1970年代の組換えDNA技術と培養細胞へのDNA導入技術の発展が基本となっている。1980年に Gordonらが、単離した遺伝子をマウス受精卵の前核に注入することにより、それがマウス染色体に組み込まれることを初めて示し、2年後の成長ホルモン遺伝子の発現によるスーパーマウス（体重が正常の2倍あるマウスのこと）の作製で、この方法の有用性が実証された。さらに、最近の標的遺伝子組換え法の発展に

YAMAMURA Kenichi

より、これらの方法があらゆる生命科学研究の分野で応用可能となり現在にいたっている。我々は、これらの方法を用いヒト疾患の発症における遺伝要因の解析と発症過程の解析を試みており、それらを紹介したい。

2. 優性遺伝病の発症機構—ヒト疾患モデルマウス作製と病態解析

家族性アミロイドポリニューロパシー (FAP) は全身性アミロイドーシスの一種であり、全身の細胞外へのアミロイド沈着を特徴とする常染色体優性遺伝病である。臨床的には末梢神経及び自律神経の異常を主徴とするが、末期には腎不全、感染症等で死亡する。アミロイドの主成分は1アミノ酸が置換した変異トランスサイレチン (hTTR: Met30) 分子であり、日本では大部分30番目のバリンがメチオニンに置換している。遺伝子も既に単離され、1アミノ酸置換に一致する塩基置換が認められている。遺伝子診断も可能でFAP患者全員が少なくとも一つの変異遺伝子を持つ。したがって、変異遺伝子の存在が発症の主たる要因である。しかし、同一家系でも発症年齢が40歳以上ずれることもあり、種々の要因が発症に関与する。これらの要因を明らかにするため、目的に応じたプロモーターに接続したヒト変異遺伝子およびヒト血清アミロイド成分遺伝子をマウス受精卵に導入しトランスジェニックマウスを作製した。

(1) トランジェニックマウスにおけるアミロイド沈着の組織分布

当初トランスジェニックマウスの系で強力であると考えられたメタロチオネインプロモーターにhTTR: Met30 遺伝子を接続しトランスジェニックマウスを作製した。このマウスにおけるアミロイド沈着を病理切片を作成して解析したところ、ヒト患者で見られるのと同様な組織、すなわち、腸、腎臓、心臓、皮膚、甲状腺等で沈着が見られた。発現部位と沈着部位は一致しないことから、変異分子は一旦血中に分泌された後各組織に沈着することがわかった。しかし、ヒトでの特徴であ

る末梢神経や自律神経系にはまったく沈着していなかった。

(2) トランスジェニックマウスにおけるアミロイド沈着の開始時期

病気の発症は思春期以降であるが、アミロイド沈着がいつから始まるのか不明である。2つの可能性があり、第1は出生前後から沈着は始まるが思春期になり症状発現に必要な域値を超えるという説である。第2は、アミロイド沈着も思春期以降に起こると考える説である。この点を解析するためにはメタロチオネインプロモーターは適切でないのでトランスサイレチン自身のプロモーターをもつ6.0-hTTR: Met30 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、6か月ごとにアミロイド沈着を解析した。その結果、アミロイド沈着は生後6か月 (ヒトでいえば30から40歳に相当) 以降にしか起こらないこと (表1)、したがって、アミロイド沈着も何らかの理由で思春期以降に起こることが明らかになった。

表1 アミロイド沈着の開始時期と組織分布

	6M		12M		18M		24M	
	M	F	M	F	M	F	M	F
60	心臓	-	-	-	-	-	-	-
	腎臓	-	-	-	-	-	-	-
	小腸	-	-	++	++	++	++	++
	皮膚	-	-	-	-	-	-	-
	座骨神経	-	-	-	-	-	-	-
MT	心臓	-	-	++	++	++	++	++
	腎臓	-	-	++	++	++	++	++
	小腸	++	++	++	++	++	++	++
	皮膚	-	-	+	+	+	+	+
	座骨神経	-	-	-	-	-	-	-

-、アミロイド沈着なし；±、血管壁に限局；+、血管壁とその周囲；++、間質に中程度；+++、間質および実質に多量

(3) アミロイド沈着に関与する環境要因

1歳齢のトランスジェニックマウスにおいて血中の変異タンパクの量とアミロイド沈着を比較すると、血中量は変わらないのにアミロイド沈着が多量に見られるマウスとまったく見られないマウスとが存在する。これらの実験においては近交系マウスを用いており、遺伝的背景は同一と考えられるので、このアミロイド沈着の差は明らかに環境要因によると考えられた。そこで2つの異なった飼育環境下、すなわちコンベンショナルな条件下とSPF (specific-pathogen free) 条件下でマウスを飼育しアミロイド沈着への影響を解析し

た。その結果、SPF下ではまったくアミロイドが沈着しないことが明らかとなった。このことは、典型的な優性遺伝病であっても環境要因がその発症に大きく影響すること、その環境要因をコントロールすることにより発症を完全に防止できることを示唆している。

3. 既存のモデルマウスを用いた解析— 自己免疫疾患へのアプローチ

NOD (non-obese diabetic) マウスはヒト I 型糖尿病のモデルマウスであり、自己免疫の機序に基づいてまず膵ラ氏島へのリンパ球浸潤 (ラ氏島炎) が始まり、やがてラ氏島が完全に破壊され糖尿病が発症する。これまでの研究から少なくとも 4 つの遺伝子座が糖尿病の発症に関与すること、連鎖解析からこれらの遺伝子座が第 1, 3, 11, 17 番染色体上にあることが明らかにされている。これらの遺伝子座の中でもっとも解析が進んでいるのが Idd-1, すなわち MHC 遺伝子座である。ヒトにおいても I 型糖尿病と特定の MHC クラス II 分子の関連が突き止められていたが、MHC はもともと多型形質であること、この領域に多くの遺伝子が存在することからどの遺伝子のどのアミノ酸の変化が糖尿病の発症に関与しているかの証拠は得られていない。我々はクラス II 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製することにより以下のことを明らかにした。

クラス II に関して NOD マウスは 2 つの特徴を持つことが明らかとなった。すなわち I-E の欠損とユニークな I-A の存在である。I-E の欠損は E α 遺伝子の一部に欠失があるため、E β は産生されている。I-A の A α 鎖は d ハプロタイプである。A β 鎖の β 2 ドメイン以下はやはり d ハプロタイプと同じであるが、 β 1 ドメインが NOD 特有で特に A β 鎖の 56, 57 番目のアミノ酸が他のマウスでは Pro-Asp となっているのに対し His-Ser となっている。ヒト I 型糖尿病においても HLA-Dq 鎖の 57 番目のアミノ酸が Asp であると抵抗性になるといわれており、同じア

ミノ酸の変異があったわけである。そこで、E α^d 遺伝子, A α^k 遺伝子, A β^k 遺伝子, A β^k :57Ser 遺伝子 (57 番目がセリンだと糖尿病の発症を阻害できないことを予測した) を導入したトランスジェニックマウスをそれぞれ作製し, I-E, I-A k , I-A k :57Ser を NOD マウスで発現させた。その結果、いずれにおいてもラ氏島炎の頻度は減少すること (表 2), したがって I-E の欠損とユニークな I-A の存在がラ氏島炎発症に必要であること, 57 番目のアミノ酸がラ氏島炎の発症に関与しうことは事実であるが、そのみで決定されているのではなく A β 鎖の他のアミノ酸あるいは A α 鎖も関与しうことを明らかにした。

表 2 I-E および I-A トランスジェニックマウスにおけるラ氏島炎の頻度

Transgenic mice	Sex and No. of mice	Level of I-E or I-A k	Insulinitis (%)
NOD	F 16	(-)	13/16 (81%)
	M 14		12/14 (85%)
NOD-E α^d	F 11	~100%	0/11 (0%)
	M 14		0/14 (0%)
NOD-A β^k	F 24	~20%	20/24 (83%)
	M 21		18/21 (86%)
NOD-A α^k	F 4	~5%	3/4 (75%)
	M 4		4/4 (100%)
NOD-A β^k :57Ser	F 7	~50%	7/7 (100%)
	M 10		10/10 (100%)
NOD-A α^k A β^k	F 14	43~872%	5/14 (36%)
	M 15		4/15 (27%)
NOD-A α^k A β^k :57Ser	F 5	48~134%	1/5 (20%)
	M 7		1/7 (14%)

別の実験でクラス II のみならずクラス I も糖尿病の発症に関与することを明らかにしたが、この結果 MHC 領域における少なくとも 3 個の遺伝子が糖尿病の発症に関与することがわかりこの方法の有用性が証明されている。

参 考 文 献

1. Miyazaki, T., Uno, M., Uehira, M., Kikutani, H., Kishimoto, T., Kimoto, M., Nishimoto, H., Miyazaki, J. and Yamamura, K. (1990) *Nature* 354: 722-724
2. Yi, S., Takahashi, K., Naito, M., Tashiro, F., Wakasugi, S., Maeda, S., Shimada, K., Yamamura, K. and Araki, S. (1991) *Amer. J. Pathol.* 138: 403-412

国内情報

遺伝子組換えによる鶏用ワクチンの開発

日本ゼオン(株) 研究開発センター 生物科学研究所

柳田 昇

1. はじめに

ワクチン開発の歴史は1798年にジェンナーが牛痘ウイルスを用いて天然痘の予防を試みたことに始まり、ワクチンという言葉もラテン語で牛を意味する *vacca* に由来している。幸いにも古来から世界を震撼させてきたこの天然痘も、WHO によって1980年に撲滅が宣言された。これはワクチン史上での最大の成果であるばかりでなく、現代医学の偉業でもある。このようにワクチンは疾病予防の手段として今もその重要性がますます高まっており、特に畜産分野では治療行為がほとんど行われないうえ、予防が全てといっても過言ではない。

養鶏産業においても疾病予防は重要な課題であり、現在10種を超える疾患に対して弱毒ウイルスを用いる生ワクチンや不活化ワクチンが使用されている。さらに、これら既存ワクチンに加えて、遺伝子工学を応用して新たに優れたワクチンを開発しようとする試みもなされている。遺伝子操作で生産された病原体抗原タンパクを精製したコンポーネントワクチンの開発や、我々の目指している鶏痘ウイルス (FPV) をベクターとした組換え多価生ワクチンの開発などがそれに当たる。

FPV は鶏痘の病因ウイルスであり、その弱毒株は長らく鶏痘ワクチンとして使用されてきた。遺伝子レベルで見たFPV は全長300 kb にも及ぶ二重鎖 DNA ゲノムを持つ巨大ウイルスであり、ワクチン株のゲノムに他の

鶏病ウイルスの抗原遺伝子を挿入した組換えFPV は、複数の疾病に対応できる生ワクチンとしての可能性が期待できる。本稿ではこの組換えFPV 研究において現在までに得られた筆者らの知見を概括することにした。

2. ニューキャッスル病・鶏痘2価ワクチン

ニューキャッスル病はパラミクソウイルスに属するニューキャッスル病ウイルス (NDV) に起因する伝染性の強い呼吸器系疾患である。我々は先ずこのNDV の膜タンパクヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ (HN) または融合タンパク (F) をコードする遺伝子を予め同定しておいたFPV ゲノムの非必須領域に導入して組換えウイルスを構築した¹⁾。両遺伝子は川喜多正夫博士の御好意によりcDNA の形で入手した。遺伝子の導入にはワクシニアウイルスで実績のある相同組換え法を応用し、組換え体選択マーカーとしては大腸菌の β -ガラクトシダーゼをコードする *lacZ* 遺伝子を利用した。

こうして得られた組換えウイルスを純化した後、抗NDV 抗血清あるいはHN, Fタンパクに対するモノクローナル抗体により挿入遺伝子の発現を調べたところ、HN, Fタンパクともに感染細胞の細胞質および細胞表面に存在することが間接蛍光抗体法により確認された。また、いずれの発現タンパクもNDV 感染細胞にみられるものと同一の大きさであることも免疫沈降法により確認した。そこで次に、1日齢～2週齢のSPF (清浄) 鶏にこの組換えウイルスを接種し、2～3週後に強

Y ANAGIDA Noboru

毒 FPV や強毒 NDV で攻撃したが、いずれの組換え体も FPV や NDV に対して80%以上の高い感染防御効果を示した。さらに、HN を発現する組換え体を2週齢鶏に接種し感染防御試験を免疫後17週まで実施したが全て良好な防御率が得られ、免疫持続についても満足すべきものであることがわかった。

一方、組換え FPV に対する移行抗体の影響を検討する目的で抗 FPV 抗体で組換えウイルスを処理したところ、親株と同じくワクチンテイクが阻止されたのに反して、抗 NDV 抗体は何ら影響を与えなかった²⁾。しかし、抗 NDV 移行抗体を保有する市販鶏を用いた NDV 攻撃試験では予想外に低い感染防御率しか得られなかった。そこで我々はこの原因を組換えウイルスが産生する抗原の移行抗体によるマスキングと予想し、抗原タンパクの発現量を増大させる目的でそれまで使用していたワクシニアウイルスの7.5kDa プロモーターに変えて合成プロモーター³⁾を使用した組換え体を構築した。その結果、予期したとおり HN および F タンパクの発現が増強され、移行抗体保持鶏においても NDV 攻撃に対して満足できる感染防御率が得られた。

これらの結果を踏まえ我々は現在 HN, F 両遺伝子を同時に発現する組換え FPV をワクチン候補株として選択し、米国シントロ社との共同プロジェクトにより米国農務省にワクチン製造承認申請を行っている。また、近い将来このような組換えワクチンの製造承認申請を日本でも行っていきたいと考えている。

3. マレック氏病・鶏痘 2 価ワクチン

マレック氏病はヘルペスウイルス科に属するマレック氏病ウイルス (MDV) に起因するウイルス性腫瘍である。この MDV は3つの血清型に分類され、そのうち血清型1のみが病原性を示す。そこで、血清型1に特異的に発現するリン酸化タンパク pp38 と、主要抗原タンパクと考えられていた糖タンパク gB の組換え FPV による発現を検討した。構築純化したこれらの組換え体の感染細胞を間

接蛍光抗体法、Western blot 法、免疫沈降法およびフローサイトメトリーにより解析した結果、MDV 感染細胞と同様に pp38 はリン酸化され、gB は100kDa、60kDa および49kDa の3つの糖タンパクとして感染細胞表面に発現していた³⁾。

次に、これら組換え体を用いて MDV 感染防御試験を実施した。表1に示すように、1日齢の鶏に MDV-gB の組換え体を接種し、6日後に強毒 MDV として知られる GA 株や超強毒株として知られる RBIB 株、Md5 株で攻撃したところ、いずれも良好な防御結果が得られた⁴⁾。しかしながら、MDV-pp38 組換え体の場合には有意な感染防御結果が得られず、pp38 には感染防御抗原としての機能が認められなかった。

表1 種々の MDV 強毒株による攻撃試験

ワクチン	チャレンジ株	防御率 (%)
非接種	GA	0
FPV/MDV-gB	GA	100
非接種	RBIB	0
FPV/MDV-gB	RBIB	90
非接種	Md5	0
FPV/MDV-gB	Md5	100

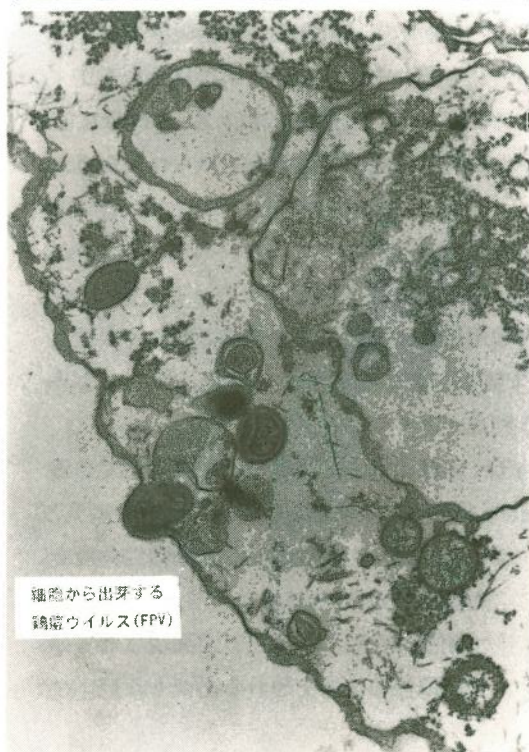


図1 ニワトリ繊維芽細胞

4. その他の鶏病に対するワクチン

鶏伝染性喉頭気管支炎 (ILT) も MD と同じくヘルペスウィルスに起因する疾患である。そこで、MDV の場合と同様に ILTV の gB 遺伝子を組み込んだ組換え FPV を構築し感染防御試験を実施したところ、FPV に対しても ILTV に対しても顕著な効果が認められた。一般に現行の ILT 生ワクチンは強毒株への復帰が懸念されているが、我々が開発した組換え FPV が ILT を引き起こす恐れは皆無で、より安全性の高いワクチンが開発できるものと期待している。

レティキュロエンドスレオシスウィルス (REV) は鶏や七面鳥の白血病を引き起こすレトロウィルスである。我々はこの疾患についても組換え FPV 技術によりワクチンが開発できるものと考えて、REV の膜タンパク (Env) を発現する組換え FPV を構築した⁵⁾。この組換え体は 1 回接種では免疫鶏に REV 中和抗体価の上昇をもたらさなかったが、複数回の接種で有意に中和抗体の誘導が認められた。ついで、1 日齢の鶏に本組換え体を接種し 2 週目に REV-SNV 株で攻撃したところ、攻撃前の中和抗体価が検出限界以下であったにも関わらず、非免疫鶏に見られるウィルス血症が全く観察されず、REV 感染に特異的な体重増加抑制現象も認められなかった。

5. おわりに

鶏用組換え多価生ワクチンの開発に組換え FPV システムを応用する場合、以下のような利点が考えられる。

- ① 1 回の免疫で複数の疾患に対処できる (ワクチンウィルス間の干渉がない)。
- ② 不活化ワクチンと異なり細胞性免疫をも誘導できる。
- ③ 免疫に重要な抗原だけを発現させるので病原性の復帰を恐れる必要もない。

④ ワクチンが未開発の疾患にもワクチン開発の可能性が期待できる。

さらに、他の DNA 組換え技術、例えば、組換えヘルペスウィルスなどと比較しても組換え FPV 技術には幾つかの長所が認められる。

- ⑤ FPV は鳥類にしか感染せず安全性が高い。
- ⑥ FPV は細胞質のみで増殖し染色体へのインテグレーションが起こらないため、予期し得ぬ危険が生じる可能性は極めて小さい。
- ⑦ 凍結乾燥が可能で、製品の取扱いが容易である。
- ⑧ 巨大 DNA ウィルスであるため、10 種類以上の抗原遺伝子の同時挿入が可能と考えられる。

現在我々は NDV ワクチンや MDV ワクチンの改良に加えて細菌性あるいは原虫性疾患に対するワクチン開発にも取り組んでおり、最終的には数種以上の疾患に対処できる多価生ワクチンを生み出していきたいと考えている。

最後に、本稿に示した研究結果は、塩野義製薬 (株) 油日ラボラトリーズ、米国農務省 Avian Disease and Oncology Laboratory およびデラウェア大学との共同研究によるものであることを申し添え、併せて関係各位に謝意を表したい。

文 献

- 1) Ogawa, R., et al. (1990) *Vaccine* 7: 486-490
- 2) Iritani, Y., et al. (1991) *Avian Dis.* 35: 659-661
- 3) Yanagida, N. et al. (1992) *J. Virol.* 66: 1402-1408
- 4) Nazerian, K. et al. (1992) *J. Virol.* 66: 1409-1413
- 5) Calvert, J.G., et al. (1993) *J. Virol.* 67: 3069-3076

遺伝子分析による検査および診断

日本生物科学研究所

加藤 篤

1. はじめに

遺伝子の本体が核酸であることが判明してからはほぼ1世紀が過ぎ、現在では核酸はコンピュータにおけるフロッピーディスクのように情報の記録媒体であることが広く認められている。近年の遺伝子工学の発展は新たな技術革新がいかに波及効果があるものかを教えてくれている。従来、感染症の診断には病原体の分離、同定が最も重要視されており、多くの労力がこのために割かれてきた。培養技術の革新時には病原体の純粋培養が、生化学の発展時には酵素学的な同定方法が用いられ、現在はモノクローナル抗体技術を用いた抗体による抗原検査が押し進められている。こうした、いわゆる遺伝子の発現産物である物質を検出し、診断に用いる方法の他に10年ほど前からDNAあるいはRNAをプローブとした遺伝子そのものを検出するハイブリダイゼーションの臨床応用が検討されはじめた。その優れた特異性から一部では早くから注目されていたが、放射性同位元素を用いずに感度をあげることや多数の検体を取り扱うことの困難さから広く普及するには至らなかった。

こうした問題のうちハイブリダイゼーション法は酵素標識したプローブとケミルミネッセンスの組み合わせにより感度的に大幅に改善されている。核酸診断が急速に普及したのはPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）の実用化に負うところが大きく、検出感度、多検体処理能力は飛躍的に進歩した¹⁾。この方法の詳細な解説は専門誌に譲るとして本稿では著者が行ってきたPCRを用いたウィルスの型別法について概要を述べる。

細な解説は専門誌に譲るとして本稿では著者が行ってきたPCRを用いたウィルスの型別法について概要を述べる。

2. なぜ遺伝子診断が有効か

伝染性気管支炎 (IB) は世界的に蔓延しているニワトリの疾患で、伝染性気管支炎ウイルス (IBV) によって引き起こされる。IBV はコロナウイルスの仲間で RNA を遺伝子として持ち、容易に抗原変異を起こすことから、非常にたくさんの血清型が世界中で分離されている²⁾。IBV の血清型は交差ウイルス中和試験により 8 型あるいはそれ以上に分けられている。IBV 感染はニワトリの増体率および産卵率を低下させ、このため養鶏業界では大きな損失を被っている。本病の予防にはワクチンが用いられているが、ワクチンを接種したにも関わらず発病するケースが多く知られている。ワクチンの接種ミスやニワトリの個体差がその原因として考えられているが、これらはマイナーなケースで、大部分の場合は野外流行株とワクチン株の血清型が一致せず、十分な防御能が得られなかったためと考えられている。こうした事態は流行株を同定しないうちにワクチン接種を行ったために引き起こされるものであり、複雑で時間のかかる交差中和試験に代わる簡便な株型別法があれば被害は減少させられると考えられる。そこで著者らは抗原変異はその遺伝子の変異に基づくことから、遺伝子の変異を利用した株型別を検討した。

3. PCR プライマーの選択

上述の目的のために PCR を用いてウィルス遺伝子の一部を増幅させ、その制限酵素断片長から型別を行った。PCR に用いるプライマーは IBV の遺伝子の中から、ウィルス中和に最も深く関わっているスパイクタンパク質 (S) 遺伝子に注目し、設定した (図 1)。既知の 4 株の S 遺伝子の塩基配列^{3, 4, 5, 6)}を比較したところ、遺伝子内部には変異の集中した部分が認められた。この中から、株間にかたよりに変異が認められる S 遺伝子の中央部分を PCR の増幅標的とし、その両側にプライマーを合成した⁷⁾。この部分は著者らが行った各種血清型の代表株を含めた 13 株のすべてで増幅され、しかもサイズにも変わりがなかった。これはこのプライマー部分が IBV で保存された領域であることを示しており、IBV の同定方法としてもこの PCR が使えることを物語っている⁸⁾。

4. PCR による IBV cDNA の増幅

野外分離された IBV は発育鶏卵に接種し、24 時間目に漿尿液を 0.1ml 採取する。採取

液は SDS, EDTA 存在下でプロテアーゼ K 処理を 37°C で 1 時間行い、フェノール/クロロホルムを用いて除タンパクを行えばよい。先に述べたように IBV は一本鎖の RNA をゲノムとしてもつことから PCR に先だて、抽出した RNA を加熱急冷後に逆転写酵素とプライマーを加え、37°C で 1 時間反応させて cDNA に逆転写する。この一部を鋳型 DNA として、プライマー、TaqDNA ポリメラーゼを加えてプログラムインキュベーターにより温度を上げ下げして鋳型 DNA を何億倍にも増幅させるわけである。著者らは 94°C 1 分、52°C 1 分、72°C 2 分を 1 サイクルとして 25 回のサイクルリピートを行った^{7, 8)}。この間のステップは一日以内に行うことができる。

5. 増幅 DNA の RFLP

増幅した DNA のサイズが同じであっても制限酵素切断断片の株による違い (RFLP) から増幅 DNA 部分にある塩基の変異部分を明らかにし、株の型別をすることができる。著者らは既知の IBV 塩基配列より切断点の認められる制限酵素を 9 つ選び、これらを用いて増幅 DNA の切断を行ったところ、期待したように株によって切れ方に多くのバリエー

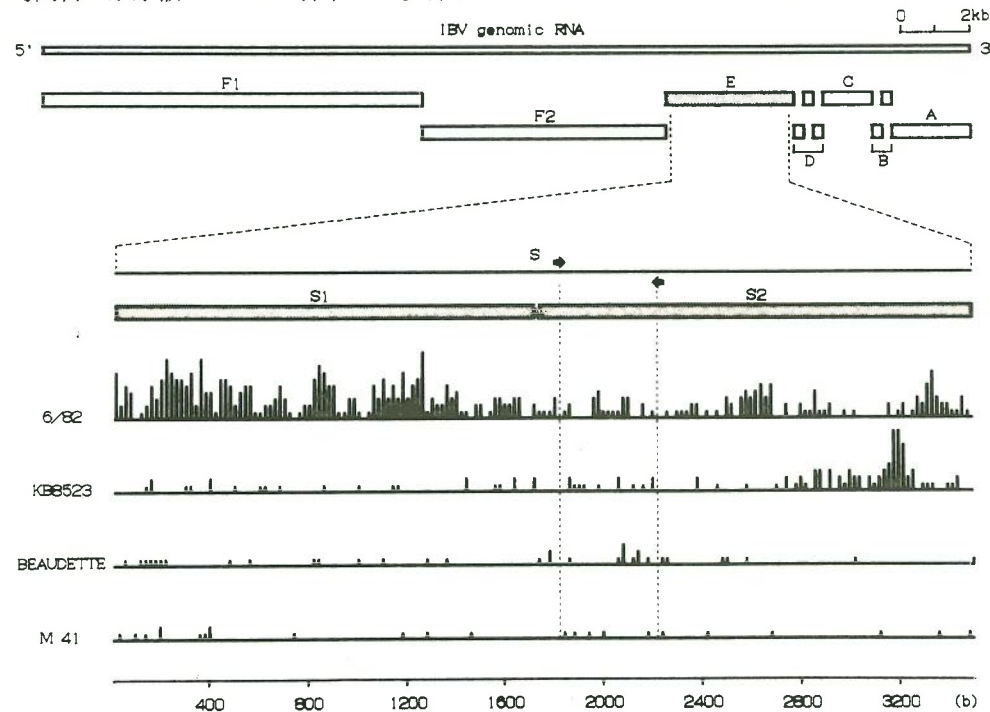


図 1 IBV の遺伝子とプライマー設定部位

ションが存在することが判った (図2)。

TaqDNA ポリメラーゼは初期の頃、必要以上にポリメラーゼとしての複製エラーが強調されていたが、一つの株由来の増幅 DNA の切断形式は恒に同じものであり、複数の切れ方を示した例はなかった。このことはTaq

DNA ポリメラーゼのエラーは25サイクル程度の増幅で、且つ制限酵素の切断形式で判定する限りでは無視できることを意味している。実際、PCR で増幅した DNA をベクターにクローニングし、その塩基配列を同時にとった4つのクローン間で比較してもほとんどの場合一致しており、エラーについてはそれほど気にする必要はないと思われる。また、最近ではブルーフリーディング機能を備えた耐熱性DNA ポリメラーゼが市販されており、エラーが疑われる場合には代わりに使うことができる。著者らの試験で以前に野外材料が2つの切断形式を示したことがあり、DNA ポリメラーゼのエラーを心配したが、自然感染する前に接種されていた生ワクチン株が分離材料に混ざっていたためだと判明した。こうした事実はPCR とRFLP によるDNA の型別の信頼性の高さを表すものである。

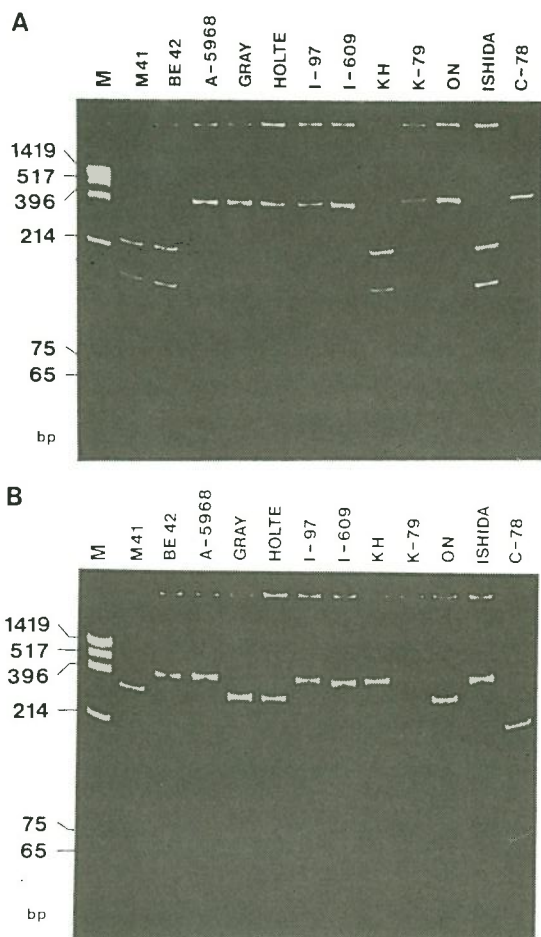


図2 制限酵素による増幅DNAの切断 (A)HpaII切断像 (B)MaeIII切断像 Mは分子量マーカー

6. IBV 株型別

9つの制限酵素を用いて7つの各血清型代表株を含む13株由来の増幅DNA を切断したところ、全部で17の制限酵素切断部位が確認された⁸⁾。この切断点の有無をそれぞれの株ですべて一致するものを0、すべて異なる場合を17として一覧表を作製した (図3)。その結果、変異の数 (スコア) が3以下の株を一つの型と考えると従来の血清型による分

		C-78	Y-4	宮崎-1	I-609	Be42	KH 石田	M41	Holte	Gray	ON	I-97	A-5968
V	C-78	—	7		7								
	Y-4	7	—	3					7				
VI	宮崎-1		3	7	5			7	6			7	
	Iowa609	7		5	—	6	4	6	5	6	7	6	7
I	Be42				6	—	2	2	3	6	7	4	7
	KH/石田				4	2	—	2	3	4	5	4	5
	M41			7	6	2	2	—	1	4	5	4	7
II	Holte		7	6	5	3	3	1	—	3	4	3	6
	Gray				6	6	4	4	3	—	1	4	5
III	ON				7	7	5	5	4	1	—	5	4
	Iowa97			7	6	4	4	4	3	4	5	—	3
	A-5968				7	7	5	7	6	5	4	3	—

IBV株間の変異度による相関
変異度 1~3: [light gray], 4~7: [medium gray], 8~11: [dark gray]

図3 IBV株間の変異スコア

け方と非常に近いものになることが判明した。しかも各々の型との近縁関係もスコアから知ることができる。最も古典的なマサチューセッツ血清型を中心として、分離年の若いアイオワ97血清型、コネチカット血清型とアイオワ609血清型が左右に広がっている様子が伺える。さらに、近年西日本を中心に発生が認められている C-78 株や腎炎を引き起こす Y-4、宮崎-1 といったものが端に位置され、最も変異が進んでいることを示している。

7. 株型別の有用性

株の相関関係を遺伝子から知ることの利点は、迅速に IBV の流行調査が行え、最も適切なワクチンを現場で使ってもらえることである。こうした流行調査は場合によっては抗体検査では拾えないアミノ酸変異を伴わないサイレントな IBV の変異をまったく新しい株の出現の兆候として捕らえられるかも知れず、早期発見といった公衆衛生上の役割は大きい。また、一方ではワクチン接種したにも関わらず病気がかかったニワトリが弱毒不完全な生ワクチンのために起きた事故なのかあるいはワクチンを無効にする新型株のためなのかを検証することもできる。また、この方法はもちろん他の変異し易い病原体の検索にも利用でき⁹⁾、さらに持続感染する宿主細胞の奥底に潜んでしまうような病原体にも有効に活用できることを最後に付け加えておく¹⁰⁾。

8. おわりに

近年、感染症の診断に遺伝子レベルのアプ

ローチが急速に増えている。その理由として感度の高さ、再現性、迅速性があげられる。しかし、以前に比較して多数の検体をこなせるようになったと言っても、現在の生化学的検査にはとても及んでいない。それは判定を電気泳動に頼っているためであるが、こうした点については近いうちに必ず改善されるだろう。

最後に執筆の機会を与えられた本研究所、上田進主任研究員に感謝いたします。

文 献

- 1) Henry, A. Erlich 編 (1990) 「PCR テクノロジー：DNA 増幅の原理と応用」加藤郁之進監訳、宝酒造
- 2) Cook, J.F.K. et al. (1984) *Avian Pathol.* 13 : 733-741
- 3) Binns, M.M. et al. (1985) *J. Gen. Virol.* 66 : 719-726
- 4) Niesters, H.G.M. et al. (1986) *Virus Res.* 5 : 253-263
- 5) Binns, M.M. et al. (1986) *J. Gen. Virol.* 67 : 2825-2831
- 6) Sutou, S. et al. (1988) *Virology* 165 : 589-595
- 7) Lin, Z. et al. (1991) *Arch. Virol.* 116 : 19-31
- 8) Lin, Z. et al. (1991) *Arch. Virol.* 120 : 145-149
- 9) Lin, Z. et al. (1993) *Avian Dis.* 37 : 315-323
- 10) Zhu, G.S. et al. (1992) *Avian Dis.* 36 : 637-645

産業動物のゲノム解析

——特に家畜の個体識別を目的としたゲノム解析——

J R A 競走馬総合研究所・生命科学研究グループ

向山明孝

1. はじめに

産業動物であるウマ、ウシ、ブタ、ニワトリなどにおけるゲノム解析の目的の1つに、個体識別のための多型性 DNA マーカーの開発がある。

例えば、ウマの場合は、血統登録のための個体識別や親子判定、またウシやブタの場合は、効率的な改良増殖を目的とした人工授精が一般的になっているが、人工授精の凍結精液の取り違いによる父子判定、さらに過剰排卵誘起法および体外授精法の発達に伴って、移植した胚の個体識別や卵性診断などにおいて、従来の血液型判定に代わる新しい判定指標として多型性 DNA マーカーが注目されている。

今日までに、産業動物においては多型性を有する DNA マーカーの研究は、ヒトおよびマウスなどの実験動物に比較してやや遅れをとっている。しかし、最近では各種の家畜において遺伝子マッピングや生理活性物質の発現や調節を支配する遺伝子および遺伝的疾患に関与する遺伝子の検索などを目的としたゲノム解析を行っていくなかで、いくつかの有益な多型性 DNA マーカーが次々と発見されている。

そこで、産業動物の個体識別や親子判定に利用可能な多型性 DNA マーカーの種類や特徴について、ヒトや実験動物の例と対比して述べてみたい。

2. 遺伝子非コード部位における多型性 DNA マーカー

家畜ゲノムの遺伝子非コード部位であるイントロン（介在配列）には、多数の繰り返し塩基配列構造、すなわちサテライト DNA が平均 1 kbp に 1 か所の割合（合計 3,000 か所）で存在しており、全ゲノムの約 40% を占め、かつヘテロクロマチン部位特に動原体近傍や先端部に局在することがゲノム解析によって明らかになってきている。

反復配列構造を有するサテライト DNA のうち、10 数塩基ないし 100 塩基程度を 1 単位とする比較的短い同じ塩基配列が何回も縦列反復している部位はミニサテライトと呼ばれている。このミニサテライトでは、反復回数が家畜の各個体によって著しく異なっている部位が存在するが、この DNA の繰り返し配列数の違い、すなわち、縦列反復配列数の多型 (variable number of tandem repeats: VNTR) では、一般にヘテロ接合度が高く、極めて高度な多型性を示すため、家畜の個体識別のための有力な DNA マーカーとして最も注目されている。

この VNTR による DNA マーカーを指標にした個体識別法として、「マルチローカス VNTR」法と「シングルローカス VNTR」法が開発されている（表 1）。

マルチローカス (multi locus) VNTR による DNA 多型検出法は、多くのミニサテライト DNA に共通する配列、いわゆる“core 構造”を有するプローブを用いて、類似塩基配列を示す多くのミニサテライト部位とクロス

表1 個体識別を目的としたDNAマーカーと検査方法

DNA多型の種類		検査方法	
縦列反復配列多型 (遺伝子非コード部位)	ミニサテライト	マルチローカスVNTR多型 (DNAフィンガープリント法)	サザンプロット・ハイブリダイゼーション法
		シングルローカスVNTR多型	サザンプロット・ハイブリダイゼーション法 PCR-PAGE-E染色法
		反復配列内塩基置換多型 (MVRマッピング法, 又はデジタルDNA型法)	PCR-サザンプロット・ハイブリダイゼーション法
	マイクロサテライト	オリゴヌクレオチドVNTR多型 (2~5塩基反復配列多型)	PCR-変性PAGE
構造遺伝子内塩基置換多型 (遺伝子コード部位)		点突然変異多型	サザンプロット・ハイブリ法
		多塩基置換多型	PCR-RFLP法 PCR-逆ドット・プロット法
ミトコンドリアDNA多型		H及びL鎖内点突然変異多型	RFLP法
		Dループ内塩基置換多型	PCR-ダイレクトシーケンス法

ハイブリダイズさせて、同時に多数のDNAバンドを検出するものであり、極めて高度な多型性を示すことから、最初に研究開発したJeffreysらによって「DNAフィンガープリント」法と称されている方法である。

しかし、この方法は各ミニサテライトDNAに対するストリンジェンシーが異なるため、ハイブリダイゼーション温度および洗浄温度、ならびに洗浄回数などの条件によって、一部のミニサテライトDNAバンドが消失するなどパターンが一定化せず、再現性に問題があることが判った。このため、比較対象となる資料DNAを同時に電気泳動ゲル上で展開し、DNA分析を行なう必要があることが指摘されている。また、これらのミニサテライトDNAにおいては突然変異率が高いことや検出された各DNAバンドの正しい塩基数や染色体上の座位などを明らかにすることが困難であることなど、DNA型としての評価やデータファイル化が困難であることが判明したため、現在、この方法は親子判定の予備的検査を除き、個体識別法としては使用されていない。

一方、シングルローカスVNTRによるDNA多型検出法は、家畜ゲノムDNAのミニ

サテライトのうち、反復配列の繰り返し数の違い(VNTR)が各個体で異なることによって生じる多型現象を利用する点で、前述のマルチローカスVNTRと同じである。

この方法の特徴は、単一遺伝子座位(single locus)にのみ認められる反復配列の繰り返し数の違い(VNTR)を制限酵素によるDNA断片の長さの違い(restriction fragment length polymorphism: RFLP)として表わすことによって個体識別を行うことである。すなわち、特定の染色体上に1か所のみ存在するVNTR構造とそれに隣接する塩基配列部位を同時に認識するプローブを用いてサザンプロット・ハイブリダイゼーション法で検出するため、ストリンジェンシーが極めて安定している。また、最近ではPCR増幅法によって、VNTR部分をプライマーを用いて探索し、反復配列部分のみを短時間で多量にPCR増幅したのち、電気泳動および特異染色によって、簡便にこのシングルローカスVNTR多型を分析する方法が開発されている。

この方法では1種類のシングルローカスVNTRプローブを用いた場合、検出されるDNAバンドは1ないし2本であるが(両親から遺伝した[繰り返し配列数]が同じであ

る同型接合体の場合には1本のDNAバンドのみが検出される), DNAバンドの出現頻度は数%と低く, その異型接合率も極めて高いため, 高度な個体識別が可能である。さらに, 各個体のDNAパターンは, 比較的小さな塩基配列数の範囲に分布しているため, DNA標準マーカーないし allele マーカーとの対比によって, 各対立遺伝子を allele No. またはグループ No. として表示することができる。しかし, 1種類のシングルローカス VNTR プローブを用いてのDNA型分析では, 各個体に対して両親からそれぞれ1つずつのVNTR 遺伝子(1種類の繰り返し配列数)が遺伝されるため, 兄弟姉妹間においては同型である例が出現し, 親子判定には有効であるが, 一家系内では, 特定の個体を識別することはできないことがある。この弊害をなくすためには少なくとも数種類のVNTR プローブを組み合わせて, ヘテロ接合率を高めたDNA多型分析によって個体識別を行なう必要がある。なお, 多くの家畜のゲノム解析において, これらの利点を有するシングルローカス VNTR を指標としたDNAマーカーが検索されているが, 現在の段階では個体識別に必要な

条件を満たし, 実用化できるようなDNAマーカーを見出すまでには至っていない。

次に, 遺伝子非コード部位における多型性DNAマーカーとして注目されているのが, ミクロサテライト (microsatellite) におけるDNA多型マーカーである。すなわち, このDNAマーカーは, GT, AATあるいはGATGなど2~4塩基の繰り返し配列(短鎖縦列反復配列: short tandem repeats: STRと称されている)が家畜の核ゲノムDNAばかりでなく, 最近ではミトコンドリアDNAにおいても見いだされている。例えば, (CA)_nの繰り返し配列は核ゲノム中の50,000か所に存在すると推定されている。この反復配列の中で高度の多型性を示すものがウマ, ウシ, ブタなど数多くの家畜において報告され, すでに数種の家畜では, 個体識別や親子判定などのDNAマーカーとして利用されはじめている(図1)。このSTR多型は, 基本的にはPCR増幅によってDNAフラグメントを得たのち, 一般に比較的煩雑なRI標識法によって検査されている。最近, 著者らは蛍光標識プライマーを用いたPCR増幅及びDNAシーケンサー分析による家畜ゲノムからの

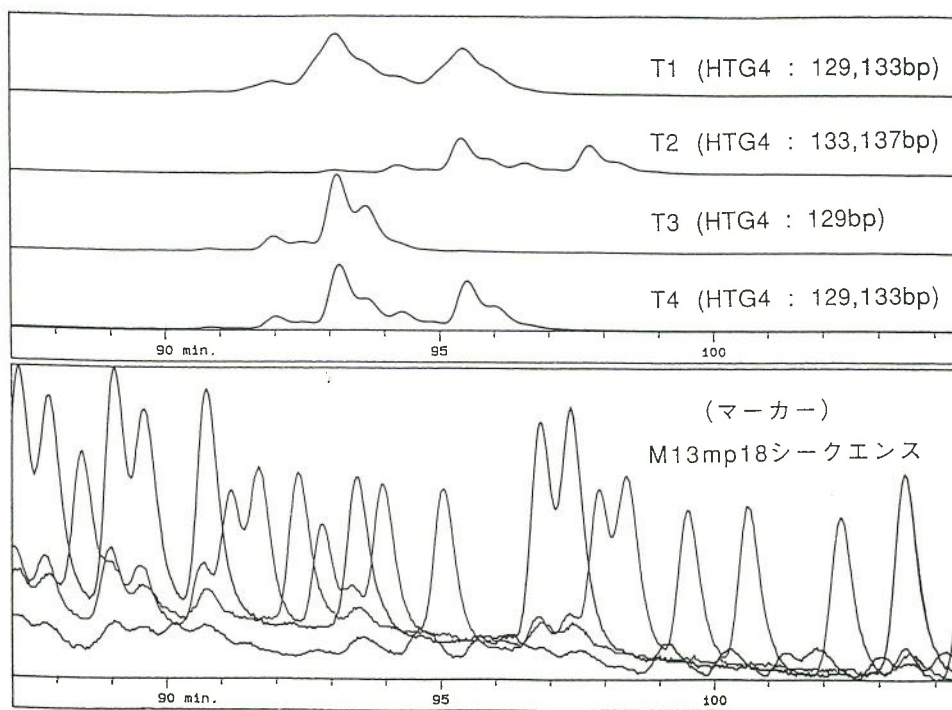


図1 STR(HTG4)多型による非血縁馬の個体識別例

STR 多型検出法を考案した。この方法は、各 STR に対するプライマー対のうち、片方のみのプライマーの5'末端にリンカーアーム付きアミダイト試薬を縮合させ FITC を標識し、この蛍光標識プライマーを用いて PCR 増幅した DNA フラグメント (PCR 産物) のサイズを、全自動 DNA シークエンサーを用いて分析するものである。特に、PCR 時に蛍光プライマーが対合した DNA フラグメントと M13DNA シークエンスラダーマーカーを、DNA シークエンス用の変性ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動分離し、レーザーによる蛍光励起光として検出するため、DNA フラグメントの size を正確に、かつ迅速に求めることができる。一般的に、STR による DNA マーカーにおいては、対立遺伝子 (allele) 数は少ないが、異型接合率が高いものが多く見つかっている。また、STR による個体識別用 DNA マーカーとしては、DNA ポリメラーゼのスッキピングによるマイナーバンドの出現をさけるため、3 ないし 4 塩基の繰り返し配列を指標とするのが得策である。

3. 遺伝子コード部位における多型性 DNA マーカーの種類

この DNA マーカーは、構造遺伝子、すなわち遺伝子コード (エクソン) 部位における塩基置換多型を指標とした DNA マーカーである。

この構造遺伝子内の塩基置換を指標とした DNA マーカーは、点突然変異型多型と多塩基置換多型とがある。

点突然変異型多型は、ゲノム解析を行っていく中で、遺伝病や先天性代謝異常症など各種の疾患に関与する DNA 診断マーカーとして見いだされたものが多い。一般的にゲノム中には、DNA 複製時におけるミスなどによって 1 塩基の変換、挿入、あるいは欠失が 500~1,000 塩基に 1 か所の割合で認められている。通常はこれらの DNA マーカーは個体によってある制限酵素認識部位に塩基置換が

あればその部位は制限酵素で切断されるか、または切断されない、すなわち、DNA 断片の長さの違い (RFLP) となって検出されるが、対立遺伝子は 2 つのみであることから、個体識別のための高度な多型性を示す DNA マーカーとしては期待できない。

一方、多塩基置換多型を指標とした DNA マーカーとしては、家畜の血液型抗原や血清型・酵素型因子の発現・調節に関与する遺伝子、また組織適合性抗原 (MHC) 遺伝子群における多塩基置換による多型を指標とした DNA マーカーが多くの家畜で見いだされている。

このうち、産業動物における組織適合性抗原 (MHC) 遺伝子群についてはウマの ELA、ウシの BoLA、ブタの SLA、ヒツジの LA およびニワトリの B システムなどの遺伝子群について部分的にクローニングがなされ、特にウシのクラス II 遺伝子と考えられる DR および DQ 遺伝子、またウマの DQ β 遺伝子の塩基配列の解読によってそれらの領域内において多型性を示す塩基置換配列が明らかになりつつある。しかし、現状では、ヒトの HLA のクラス II 抗原の 1 つである DQ α 抗原の複数個の対立遺伝子に見られるような個体識別に有用な DNA マーカーは各家畜ともにまだ見出されていない。

これらの多塩基置換による多型は、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法ないし PCR 増幅法を用いた RFLP 解析によって DNA 型として検出することが可能であるが、PCR 法による DNA 増幅及び Reverse Dot-Blot 法を利用した簡単な検査法、さらに最近では、一本鎖高次構造多型解析法 (PCR-SSCP) も用いられるようになってきている。

4. ミトコンドリア DNA における多型性 DNA マーカー

家畜の組織細胞中の細胞質に存在し、エネルギー生産の働きを担っているミトコンドリアには、核 DNA とは異なるもう 1 種類の DNA、すなわちミトコンドリア DNA (mtD

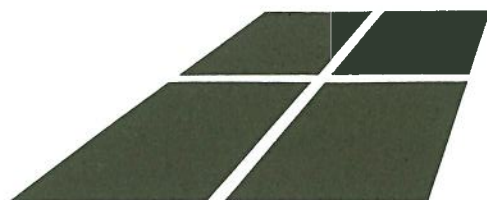
NA) が存在している。産業動物において、このmtDNAの全塩基配列が解読されているのはウシのみである。他の家畜では現在 mtDNA の複製の開始部位であるDループ領域を中心にして塩基配列解読のためのクローニングとシーケンシングが行われている。mtDNA は母性遺伝しているため、正確には個体識別を目的としたDNA マーカーとは言えないが、移植した胚と母畜との母子判定には重要なマーカーとなる。mtDNA における多型性マーカーとしては、Dループ以外のHおよびL鎖における遺伝子構成部位の塩基配列に生じた点突然変異多型とDループ内の極めて塩基置換の速度が早く多型性に富んでいる部位の多型を指標としたものがある。

前者は主に制限酵素によるDNA断片の長さの違い(RFLP)として検出され、後者はPCR-ダイレクトシーケンス法あるいはPCR-

SSCP法によって検出されている。なお、産業動物におけるmtDNAのDループの塩基配列では、品種間で最も変異が多く認められており、各家畜の進化解析の指標として用いられている。

5. おわりに

このように、複数胚移植、多胎妊娠、卵割胚によるクローン家畜の生産など多子生産技術に伴う個体識別や親子判定などの指標として、これらの各種のDNAマーカーは極めて重要なものとなっているが、一方では、有用形質に関与する遺伝子との連鎖解析にこれらのDNAマーカーが利用されており、今後産業動物のゲノム解析において多型性DNAマーカーは益々研究が盛んになっていくものと思われる。



農業試験研究一世紀記念シンボルマーク

水田をシンボルとすることで歴史を、透視図にすることで広がりと発展を表現しました。

国内情報

畜産とバイオテクノロジー関係の既掲載情報についてのご案内

畜産とバイオテクノロジーにつきましては、既に下記について本誌に掲載しております。今回の特集と併せてご利用下さい。

胚移植

ニワトリ受精卵の体外培養 (1988)

14: 4-6 内藤 充 (畜産試験場)

凍結保存胚由来の子豚生産 (1990)

18: 8-11 小栗 紀彦 (畜産試験場)

免疫

牛型モノクローナル抗体作製法の開発 (1990)

19: 1-4 小野寺節・吉原一浩 (家畜衛生試験場)

家畜の成長と繁殖能力制御のための免疫学的アプローチ (1992)

29: 25-27 Bernard Laarveld (サスカチュワン大学)

豚オーエスキー病サブユニットワクチンの開発 (1991)

25: 3-5 津田知幸・村上洋介 (家畜衛生試験場)

組換え牛疫ワクチンの開発 (1991)

26: 3-6 山内一也 (東京大学医科学研究所)

トランスジェニック・アニマル

ウィルス感染に強い動物の作製 (1988)

14: 7-9 岩倉洋一郎 (東京大学医科学研究所)

トランスジェニックアニマルによる物質生産 (1992)

33: 1-3 結城 惇 (ワイエスニューテクノロジー研究所)

バイオテクノロジー技術を使った優良な実験動物の生産技術 (1992)

33: 13-15 上田 進 (エヌティーサイエンス)

文献情報

擬似花を作る植物病原菌

植物病原糸状菌のライフサイクルに昆虫が関与している例は多々見られる。たとえば昆虫が数種の病原菌の分生胞子を伝播していることはすでに認められている。ある種の病原糸状菌は糖を合成し分泌することで、また感染葉は紫外線反射率を変えることで昆虫を積極的に誘引し、昆虫によって胞子の分散および伝播を引き起こしている。今回著者は、さび病菌 *Puccinia monoica* の宿主に対する影響と、それが引き起こす、昆虫の誘引を始めとした一連の現象について報告した。

さび病菌に感染した *Arabis* 種の植物体内では、菌糸が分裂組織に侵入し全身感染を起こし、宿主の生長に影響を与える。感染植物を観察したところ、宿主の形態に根本的な変化が見られた。さび病菌に感染した *A. holboellii* (アブラナ科、ハタザオ属、シロイヌナズナとは近縁) の葉数、ロゼット葉数、草丈はそれぞれ非感染植物の2倍であった。また、非感染植物では茎の伸長はみられず、根元からロゼットを形成していた。しかし、感染植物では茎は伸長し、茎の頂部は粘着性のある甘く香る浸出物でおおわれた淡黄色の感染葉が密集し、花のような構造をした感染ロゼット(擬似花)を形成していた。擬似花は非感染ロゼットおよび宿主固有の花とは全く類似性を持っていなかったが、他種植物の花とは形、色、臭い、花蜜合成などの点で極めてよく似ていた。淡黄色の感染葉の表面は精子や受精糸に満されたさび柄子器と甘いさび柄胞子液でおおわれていた。擬似花を形成する感染葉の可視光スペクトルおよび紫外線スペクトル反射率は、緑色の非感染葉とは明らかに異なっていたが、他の被子植物の黄色花とは差が認められなかった。また擬似花は、ハチ、チョウ、ハエなど多種類の花粉媒介昆

虫を誘引した。ほとんどのさび病菌は異系交配性(ヘテロタリック)であるため、受精には昆虫の媒介を必要とする。本菌でもこれについて検討した。受精の結果形成されるさび胞子は、感染植物を自然受粉した個体、あるいは昆虫とともに隔離処理した個体では形成されたが、昆虫の飛来を阻害した個体では、さび胞子の形成は認められなかった。したがって本菌の受精には擬似花への昆虫の飛来が必要であることが明らかとなった。次に、自然群落における擬似花の他花への影響を検討した。擬似花を形成したさび病菌感染 *A. holboellii* と非感染 *Pulsatilla* の2種の植物が生育している区域において、擬似花および正常花への昆虫の飛来および滞在時間を調べた結果、昆虫は擬似花に5倍もの時間滞在していた。また擬似花を含め4種の植物が生育する区域において、昆虫は全時間の88%を擬似花で過ごした。擬似花が他の植物の花よりも昆虫を引きつける理由として、花蜜が他の植物よりもかなり多いこと、蜜腺に濃縮されているだけでなく、擬似花の表面全体に広がっていることが考えられた。植物が胞子の風媒伝染によってさび病菌に感染した場合、同一宿主植物上に2種類の接合型(交配型)が存在している可能性が高い。したがって擬似花で昆虫を長い時間引き留めておくことは、昆虫の媒介によるさび病菌の受精を促進しているのかも知れない。昆虫が擬似花に選択性を示したこと、また擬似花の存在する区域に昆虫の飛来数が増加したことから、擬似花は隣接して生育している植物の生殖にも影響を与えているかも知れない。またその影響は感染植物の生育密度、花粉媒介昆虫の擬似花と正常花との間での分配の割合、生育している植物の交配型など、いくつかの要因に依存していると思われる。

以上の結果より、さび病菌 *P. monoica* が、感染植物に形態変化を引き起こし、擬似花を形成すること、擬似花が昆虫を誘引し、さび病菌の受精を促進すること、さらに花粉媒介虫に対して擬似花と、本当の花との間で競合が起きることから、擬似花が自己の生殖のみ

ならず、混在する他種植物の生殖にも影響を与えることが明らかとなり、この植物の病気は宿主のみならず、自然群落に対しても影響を与えていることが示唆された。

(抄訳 小林晃一 東北大・農)
(KOBAYASHI Akira)

Floral mimicry by a plant pathogen

B.A. Roy

Nature, 362 : 56, 4 March, 1993

文献情報

非水溶液系における酵素反応

はじめに

近年、酵素化学反応の対象となる生体関連化合物を非水溶液系で効率良く合成しようという研究が活発に行なわれ始めてきている。この非水溶液系における生体触媒利用の研究は、基礎的な酵素化学的側面からと新しい有機合成手法開発の側面から展開されている。現在までのこれらの研究の成果を有機溶媒・酵素・反応というキーワードのみで国内特許検索をしてみると、156件の特許出願がある。きわめてラフな検索ではあるが、どの発明も有機溶媒中での酵素反応を直接あるいは間接的に意識して明細書を記述していることからその関心の高さが伺える。

非水溶液系での反応

従来、多くの既知の酵素化学反応は水溶液系で行われていた。しかし、一方でわれわれの周囲には数多くの脂溶性化合物類が存在し、生体内ではともかく試験管内でこれらのほとんどの化合物は酵素化学反応の対象とは考えてこられなかった。その一つの理由としては、脂溶性化合物を溶解した有機溶媒中で酵素反応は行えないだろう、すなわち三次構造や四次構造を形成するポリペプチド鎖は有機溶媒

中で活性発現に必要な立体構造を維持できなくなり、容易に失活してしまうのであろうことが信じられてきたためである。反対に、酵素研究者のなかには酵素精製の際、初期の粗分画のステップにおいて、分画操作に用いた有機溶媒（アセトン、トルエン、アルコール等）が酵素活性測定系に混入していたため、見かけの活性が異常に高い値を示したという経験などから、有機溶媒中でも酵素活性が十分に発現するだろうという考えもあった。

現在では、エステラーゼ類のリパーゼ、ペプチダーゼ類のサーモリシン、キモトリプシン等の酵素が有機溶媒中で酵素活性を保持することが知られている。また、有機溶媒中では微弱な活性しか示さない酵素や全く活性を示さない酵素であっても、両親媒性高分子や脂質により化学修飾を施した酵素-修飾物質複合体を調製することで活性を発現させることも可能となってきた。

一般に有機溶媒中で酵素反応を行なう方法は酵素の存在形態により二つに大別される。1)均一系反応と 2)不均一系反応である。産業技術の視点からは不均一反応系に関する研究が圧倒的に多い。

均一系反応としては酵素-修飾物質複合体を調製して有機溶媒に溶解し、利用する方法で、これは酵素をポリエチレングリコールで修飾し有機溶媒に可溶化して使用する方法が知られている¹⁾。

不均一系反応としては酵素-脂質複合体を調製して有機溶媒に分散させる方法^{2,3)}、逆ミセルを用いる方法⁴⁾などが知られている。これは有機溶媒中ではほとんどの界面活性剤はその親水基を内部に向けて集合し逆ミセルを形成しているが、この中心部に酵素、基質そしてごく少量の水分が閉鎖系で存在し、有機溶媒が入りこめないマイクロ領域で反応を行なう。これらの方法は技術的に高度性を要求されるものが多く、まず酵素と修飾剤との反応条件、基質量の調節、反応の再現性などがあげられる。また多くの場合、酵素活性を得るためにごく少量の水分を必要とすることから目的とする反応の逆反応が、たとえば加水

分解酵素が逆反応の合成反応を行ったり転移反応を促進する反応が同時進行するため、結果として収量の低下が見られる。不均一系反応の他の例としては担体（膜）に酵素を固定化して利用する方法と粉末酵素そのものを利用する方法である。酵素を担体（膜）に固定化する方法は多官能性試薬を用いて酵素分子を架橋する方法や、酵素分子を担体に共有結合、静電的相互作用、物理吸着等の方法がある⁵⁾。これらの方法で調製した固定化酵素、たとえば親水性ゲル中に包括固定したものや多孔性粒子の細孔内に架橋固定したものをカラム充填して目的物の合成に利用する。固定化リパーゼは既に食品工業の分野で実用化されている⁶⁾。最近では、活性化セルロース膜に酵素を固定化して基質溶液を連続的に膜を通過させる方法も行われている⁷⁾。カラム型リアクターで発生しやすい、ゲルの一部にしか溶液が流れないチャンネルングを回避する効率の良い方法でもある。粉末酵素そのものを用いる反応は主に基礎的研究に利用されており、酵素の凍結乾燥品を基質および数%以下の水分を含んだ有機溶媒に懸濁させて、攪拌振とうすることで行える。通常の酵素反応を制御する因子の一つに pH 制御があるが、有機溶媒中では pH 制御は無意味である。しかし、緩衝液中で経験した酵素（ α -キモトリプシン）の立体構造やイオン化の状態は凍結乾燥状態を経由して有機溶媒中でもそれが維持（記憶）されるという⁸⁾。これは、水溶液中での至適 pH の酵素活性を有機溶媒中で発現させる有効な方法である。また先に記したように、有機溶媒中で酵素を活性化するためにごく少量の水分を添加した際、時として

副反応をも進行させてしまうが、目的の反応と副反応の制御を効率よく行なうための方法として水と物理的性質の類似した有機溶媒を併用することもできる。水の水素結合力と高誘電率に近いホルムアルデヒドを用いたサーモリシンの研究例がそれである⁹⁾。

おわりに

酵素反応を非水溶液中で行なうという、いわば化学触媒を用いる場合と類似した環境下で反応利用できる途が開かれてきた。これらに関する特許出願数も約 6 割が平成年度に公開されたものである。これらの酵素反応は、医薬品工業、食品工業、農水産業分野、化粧品工業および有機中間原料分野などのより広い産業分野で応用される可能性を示しており今後の発展が期待される。

（抄訳 上岡修—日本たばこ・企画部）

(KAMIOKA Osamu)

参 考 文 献

- 1) Inada, Y. et al., (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122 : 845
- 2) 特開昭64-80282
- 3) 特開昭62-232390
- 4) Luisi et al. (1984) *J. Am. Chem. Soc.*, 106 : 7285
- 5) *Methods in Enzymology* Vol. 44
- 6) *Nikkei Biotechnology Annual Report*, 93
- 7) 特開平2-182192
- 8) Zaks, A. et al. (1989) *J. Biol. Chem.*, 263 : 3194
- 9) Kitaguchi, H. et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111 : 9272

海外便り

英国植物科学研究所での一年

農林水産省 北陸農業試験場 育種法研究室
矢野昌裕

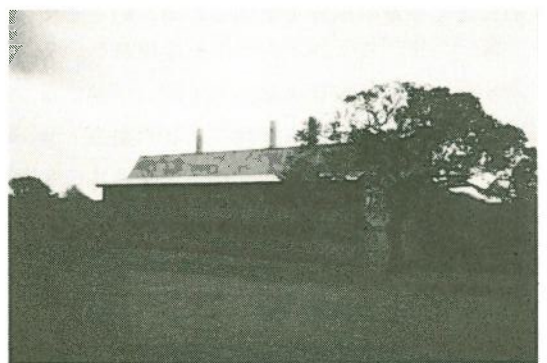
曇りとした英国特有の空模様が、ヒースロー空港に降り立った私を出迎えてくれました。これからはじまる英国留學生活の第一歩であるという感傷にひたる間もなく、入国手続きを終え、ロンドン市内のホテルへ到着する頃には、まだ午後4時頃だというのに町は夜の光景と化し、旅行も含めて海外渡航経験がほとんどなかった私にとっては期待と不安が入り交じった第一日でした。

科学技術庁の長期在外研究員として派遣されたのはノーフォーク州ノリッジ市にある植物科学研究所ケンブリッジラボラトリーで、穀類研究部の Moore 博士をグループリーダーとするコムギのゲノム解析グループに加わりました。研究課題はゲノム構造の比較植物学的研究であり、着任当初はコムギ、オオムギと *Brachypodium sylvaticum* (日本名：ヤマカモジグサ) という道端でなにげなく見かける雑草とのゲノム構造の比較に取り組みました。コムギ、オオムギはゲノムサイズが極めて大きく、特にコムギのゲノムサイズはヒトの10倍近くもあるため、ゲノム解析を進めるうえで大きな障害があります。そこでゲノムサイズが小さくかつ構造に共通性がある近縁種をモデルとして、コムギ、オオムギのゲノム解析に迫ろうとしたわけです。言い換えれば穀類のアラビドプシスを探したそうとしたこととなります。

ヤマカモジグサからイネへ

研究を始めてまもなく、ゲノミックライブ

ラリーの作成やサザン分析で、既に確保してあったヤマカモジグサの DNA が底をつき、新たに DNA を抽出するため、幼植物を得ようと播種したのですが、しばらくしてもまったく発芽せず実験を進めることができなくなってしまいました。そこでヤマカモジグサの幼植物が確保できるまでのつなぎとしてイネを比較対象とすることになりました。私自身の研究材料はイネであったこともあって、いずれ材料に加えるつもりだったのですが、英国ではまったく栽培されていないイネは、グループリーダーの Moore 博士にとってはあまり縁のない作物であったに違いありません。ともあれひょんなことからイネを実験開始早々、全面的に取り扱うことになったわけです。しばらくの間、イネの連鎖地図上に位置づけられている DNA クローンをプローブとしたコムギ・オオムギに対するサザン分析を行ったところ、意外にもかなり相同性が高いことがわかりました。Moore 博士もシントニー (syntony) マッピングの相手としてのイネに興味を示しました。それ以後 RFLP マーカーとして利用されているコムギとイネの DNA クローンを相互に用いてシントニーマッピ



留学先のケンブリッジ ラボラトリー

YANO Masahiro

ングを行なうと同時に、イネの酵母人工染色体(YAC)ライブラリーを構築し、クローンの両端配列を利用した微細レベルでの両作物種間のゲノム構造の解析を進めていきました。留学期間内ではそれほど多くのことは解析できませんでしたが、イネの同一染色体上に存在するDNAクローンはコムギ、オオムギにおいても同一染色体グループに所属することが明らかとなりました。またコムギの連鎖地図上のDNAクローンのほとんどが効率よくイネの連鎖分析に利用できることも明らかとなりました。このシントニーマッピングは帰国後も共同研究として進められており、ケンブリッジラボラトリーで進められているコムギ、オオムギ、ライムギ等の比較連鎖地図作成ともあわせて、近い将来穀類に共通する基本ゲノムの解明が期待されます。

英国植物科学研究所

派遣機関を含む植物科学研究機構ジョン・インネス研究センターはロンドンから北東約150km離れた英国のなかでも最も古い都市の一つであるノリッジ市の郊外にあります。このセンターはジョン・インネス研究所、セインズベリーラボラトリーならびに留学先のケンブリッジラボラトリーの3研究所から構成され、植物だけを研究対象とした研究機関としては世界でも類を見ない規模のものです。約300名の研究者・スタッフがムギ類、ナタネ、エンドウ等の作物を材料にした分子・細胞遺伝学、生理学的研究をはじめとしてシロイヌナズナをモデルにしたゲノム研究等まで広範な研究を行っています。研究者間の密接な連携、分析機器の効率的な共同利用、生化学、生理学、遺伝学、分子生物学関連の雑誌等の充実などの研究環境には感心させられました。またヨーロッパを中心として世界各国から、私のよ

うな訪問研究員をはじめとして、多くの研究員を受け入れています。特に中国からの研究員やpH.Dの学生は多く、かなり大きな留学生の会ができているのに対し、日本からの研究者は毎年2~3名のようなものでした。

絵画の中へ

ノリッジ市は英国のなかでも中世のたたずまいを色濃く残している町で、教会とパブ(酒場)の多さで有名な町です。石作りの建築物は私に新鮮な印象を与えてくれ、特に町中になにげなく存在する300年程前に作られた建物がパブとしてにぎわっているところなどは、古さに価値を見いだす英国人気質が伺われました。

景観の美しさに関しては、農村地帯の田園風景の右にでるものはないでしょう。春から夏にかけて英国中央部から北部のなだらかな丘陵地帯には一面緑の絨毯が敷き詰められますが、そのなかで点在するこんもりとした森と同系統の色で統一されたれんがで作られた家が集まる小さな村がうまく調和し、さらには放牧された牛や羊がちょうど良いアクセントとなって、まるで絵画の中にも入り込んだような錯覚に陥ることもしばしばありました。

おわりに

日本人の少ない英国のいなか町で数々の失敗(主に言葉や習慣の違いによる)を繰り返しながら一年間を過ごしました。これまで異文化に触れることがほとんどなかった私にとって、異なる国の、異なる考え方、異なる習慣をもつ人々の中で送ったこの一年間は私にとって研究面ばかりでなく生活面での幅を広げるうえで貴重なものとなりました。

生研報告のご案内

生研機構ではこれまでに実施した研究会、座談会、そして海外におけるバイオテクノロジー等の開発動向に関する調査結果を「生研報告」としてとりまとめております。

在庫が残り少ないものもありますが、ご希望の方は、生研機構企画部（〒160 東京都新宿区新宿六丁目24-16、日本生命新宿6丁目ビル3階、TEL 03-3205-6565）までご連絡下さい。

- No. 1 海外におけるバイオテクノロジー「欧米の研究開発動向調査報告」
- No. 2 座談会「これからの家畜改良」, 「実験動物生産の現実と技術課題」
- No. 3 座談会「加工好適米を語る」, 「もち米利用の新局面をさぐる」
- No. 4 座談会「芝草の品種・管理を考える」, 「芝草の品種改良を考える」
- No. 5 研究会「62年度漁業白書から見た水産業の動向と技術的課題」
- No. 6 海外におけるバイオテクノロジー「欧米の植物・家畜分野における最新研究開発動向調査報告」
- No. 7 研究会「畜産副産物の有効利用技術について」
- No. 8 研究会「農作業の自動化研究の現状と展望」
- No. 9 海外におけるバイオテクノロジー「イギリスにおける畜産先端研究の現状」
- No.10 イギリスにおける畜産副産物利用の現状
- No.11 海外におけるバイオテクノロジー「オセアニアにおける植物・家畜分野の研究開発動向調査報告」
- No.12 海外におけるバイオテクノロジー「アメリカにおける植物バイオテクノロジー」
- No.13 海外におけるバイオテクノロジー「組換え DNA 技術実用化の最前線」
- No.14 研究会「野菜苗生産技術の動向」
- No.15 研究会「多獲性魚類の加工流通システムの開発」
- No.16 「生物特に動物の特許をめぐる」—米英2ヶ国における調査報告—
- No.17 海外におけるバイオテクノロジー「欧州マリンバイオテクノロジー研究動向調査報告」
- No.18 座談会「食品の機能性を考える」
- No.19 座談会「海藻利用の現状と展望」
- No.20 座談会「昆虫の産業利用の現状と展望」
- No.21 「海外における植物遺伝資源の導入・保存・配布システム」—アメリカ及びイギリスについての調査報告—
- No.22 研究会「植物の病害に関する誘導抵抗性」
- No.23 「昆虫資源利用研究の現状」—米国, カナダにおける調査報告—
- No.24 研究会「水の機能性を介したエネルギーの非熱的利用」
- No.25 「海外における植物遺伝資源の導入・保存・配布システム」—イタリア, フランス, スペイン及びオランダにおける調査報告—
- No.26 「米国における畜産先端技術研究開発動向調査報告」—動物胚移植関連技術を中心として—
- No.27 研究会「搾乳ロボットの開発」
- No.28 研究会「機能性（医用）農作物の開発」
- No.29 「海外における植物遺伝資源の導入・保存・配布システム」—ハンガリー及びブルガリアにおける調査報告—
- No.30 「欧州における搾乳ロボット研究開発動向調査報告」
- No.31 研究会「実験用ミニブタの開発」

編集後記

「農業試験研究一世紀記念」協賛第二号として「畜産のバイオテクノロジー」をお届けします。今回は主に家畜を対象としたバイオテクノロジーを特集しましたが、畜産が対象とする分野はもっと広く、牧草・草地や、いま

最も深刻な問題となっている畜産廃棄物の処理も含まれます。これらの課題については、機会を改めて取り上げたいと考えています。次号は食品のバイオテクノロジーを予定していますので、ご期待下さい。 (大畑記)

ブレイン テクノニュース (第38号)

平成5年7月15日発行

発行者 浜口 義 曠

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