

シンポジウム報告①



The production of Recombinant Proteins and Transgenic Animals

シンポジウム報告「日韓科学協力事業セミナーを開催して」

島崎 敬一

北海道大学農学部

要 旨

日韓セミナー「畜産における組み替えタンパク質生産とトランスジェニック動物の作出」が、平成8年10月11～12日に、北大キャンパス内の百年記念館で開催された。日本側の開催代表者は清水弘（北大・農）、韓国側代表者は生命工学研究所（KRIBB）のLee, Kyung-Kwang（李景廣）である。また、本セミナーは日本学術振興会の事業の一つである日韓科学協力事業セミナーとして開催されたものであり、韓国側からは5人が出席し、日本側の講演者は7人であった。講演内容としては、「ミルクタンパク質のバイオテクノロジー」として、午前中に6題の発表があり、午後には「トランスジェニック動物のバイオテクノロジー」としてやはり6題の発表が行われた。講演会場には大学内外から合わせて55名が参加し、翌日のエクスカージョンでは、苫小牧市植苗にある雪印乳業(株)受精卵移植研究所を見学した。

1. はじめに

平成8年10月11～12日の2日間、日韓科学協力事業セミナー「畜産における組み替えタンパク質生産とトランスジェニック動物の作出」が北海道大学で開催された。筆者はその主催者の一員として企画から実行まで携わったので、ここにそのセミナーの内容について紹介しようと思う。講演発表のため韓国からは5人が出席し、日本側の講演者は7人であった。なお、本セミナーは日本学術振興会が平成8年度から始めた日韓科学協力事業セミナーの一つとして後援を受けて開催されたものである。初日は北大キャンパス内の百年記念館で講演会が開催され、まず日本側代表者である清水弘（北大・農）の開会の挨拶と韓国側代表者のLee, Kyung-Kwang（李景廣）の挨拶で始まった。李代表は4年間北大大学院に留学し、当時家畜育種学講座（現、家畜改良・増殖学講座）の堤義雄（当時、助教授）に家畜繁殖学の指導を受けて1984年春に博士号を取得している。現在はKorea Research Institute of Bioscience and Biotechnology（KRIBB、韓国生命工学研究所）で、家畜繁殖学の分野からさらに発展して、

発生工学やトランスジェニック動物に関して韓国における研究をリードする立場にあることなど、会場に来ておられた恩師の堤先生に対してその間の指導を感謝しながら語った。

ここで簡単にKRIBBについて紹介すると、ソウルから列車で一時間半ほどの所にある忠清南道の道庁所在地、大田市（テジョン）の大徳（テドク）研究団地内に研究所がある。近くには儒城（ユソン）という温泉があり、またEXPO'93が開催されたのでご存知の方も多いと思う。研究所は1985年にKorea Institute of Science and Technology（KIST、韓国科学技術院）のThe Genetic Engineering Centerとして設立され、1990年にはGenetic Engineering Research Instituteと改名、さらに1995年に現在の名称となっている。組織としては、Molecular & Cell Biology, Protein Engineering, Plant & Animal Cell Technology, Biomolecular Research, Applied Microbiology, Bioprocessの各研究部門があり、その他にGenetic Resources CenterとBioPilot Plantを有している。また研究員として400名を擁し、その内の44%が博士号を有しているという、非常にアクティブな研究所である。

なおセミナー当日、会場には主催している関係研究室（家畜改良・増殖学講座、酪農科学講座）のスタッフと大学院生らの他に、(株)YSニューテクノロジー研究所の上田（所長）、柏崎の両氏が栃木県から参加し、さらに雪印乳業(株)受精卵移植研究所（永井所長、高倉、長尾、岸、須藤）、道立新得畜産試験場（山本、高橋、陰山）、道立滝川畜産試験場（山田、寶寄山、内藤）、よつ葉乳業(株)リサーチセンター（元島、大津、鈴木、栗城）、サイエンスタナカ(株)（牧）などからも多くの人が出席してくれた。さらに、獣医学部の家畜繁殖学研究室の留学生も3名（申秀晶、S. H. Raza, C. Bishonsa）が出席し、講演会への参加者は合計55名にのぼった。この様に大学内外から広く来聴頂いたことは、主催者の一人として非常に嬉しかった。

2. セミナー開催の背景

日本と同様に韓国においても、トランスジェニック

動物や組み替えタンパク質を用いる研究機運が非常に高まってきている。それは、家畜の改良・育種のためのトランスジェニック動物の作出とその基礎研究を始めとして、ヒトミルクタンパク質やその他の生物学的に活性を有する物質を得るためのトランスジェニック動物の利用、あるいは動物組織や細胞、微生物などを用いた組み換えタンパク質の生産、およびそれらを治療薬、ワクチン、ホルモン、診断薬、飼料添加物、食品添加物として用いる可能性だけでなく、実際すでに遺伝子の機能や発現調節の研究、疾患のメカニズムの解明や医薬品のスクリーニングに用いる疾患モデル動物の開発などにトランスジェニック動物は使われているからである。そこで、我々は特に家畜・家禽などの生産に関する畜産分野一般、および乳・乳製品などの畜産食品分野における組み換えタンパク質の生産、トランスジェニック動物の作出と利用に関する日韓両国の研究の現状を、基礎と応用の両面から検討し、将来の発展の方向性についての見通しを得ることを主眼として本セミナーを企画した。

参加した日韓両国の研究グループによる研究交流は、もともとがラクトフェリンを主な研究対象としていた筆者らとの接触が発端となって始り、1992年以降相互に訪問および頻繁な研究情報の交換を行ってきた。そこで両研究グループがこれまでの研究成果を持ち寄り、今回のセミナーの形で発表の場を持つことは、これまでの部分的な共同研究や研究情報の交換の枠を越えた、よりダイナミックな飛躍をもたらすものと期待され、実施した結果は後述するようにまさに日韓両研究グループにとって期待通りの成果が得られたと評価できる。

3. ミルクタンパク質のバイオテクノロジー

講演内容としては、「ミルクタンパク質のバイオテクノロジー」として、午前中に6題の講演があり、午後には「トランスジェニック動物のバイオテクノロジー」

としてやはり6題の講演が行われた。午前の部においては、ミルクに含まれる多機能性タンパク質であるラクトフェリンに関する研究発表が4つを占めた。ラクトフェリンとは分子量が約8万の金属結合性タンパク質であり、血液中のトランスフェリンや卵白に含まれるオボトランスフェリンと非常に良く似た構造を持つタンパク質である。ミルクに含まれている他のタンパク質に比べると、生体内における機能が非常に多岐に亘っていることに特徴がある。例えば古くから知られている抗菌・静菌活性の他に、免疫賦活作用、抗炎症作用、細胞増殖制御作用などが見出されており、現在では育児用調製粉乳のほか、ペット、養殖魚などの治療薬としての用途がまず開発され、さらにヒト口内炎や歯周病などへの効果も期待されており、免疫グロブリンやリゾチームにならぶ利用価値の高いミルクタンパク質と考えられるようになってきている。そのために、組み替えタンパク質およびトランスジェニック動物研究における格好の対象ともなっている。

まず、清水（北大）の座長のもとに島崎（北大・農）は、組み替えN-lobeの作成に挑戦した成果を発表した。これはウシラクトフェリンをトリプシンによって消化した場合に、完全な半分子であるC-lobeは得られるが、Lys282-Ser283間の結合も切断されるために、完全な形でのN-lobe(340残基)を得ることはこれまでに成功していないからである。この研究ではまずウシ乳腺組織のmRNAからcDNAを合成し、N-lobe領域に特異的なプライマーを用いてPCRを行い目的の遺伝子を増幅した。次にクローニングベクターに組み込み、大腸菌JM-109株に導入した後にプラスミドの配列を確認し、さらにN-lobeの領域を切り出して発現ベクターに組み込み、大腸菌BL21株に導入してタンパク質の発現をIPTGによって誘導した。その結果、glutathione-S-transferaseとN-lobeとの融合タンパク質が発現していることを、ウェスタンブロット法で確認した。今後は融合タンパク質の精製



写真1 北大百年記念館における日韓セミナー会場の様子。最前列が清水代表。

とN-lobe部分の活性のある形での回収率の向上が課題である。

玖村朗人(北大・農)は、形質転換したマウスのミルク中に発現させたタンパク質を分離する方法についての検討を行い、それらを効率よく分離する指針を確立した過程を発表した。例えばラットミルクからのカゼインの等電点沈殿には酢酸が有効で、かつアルカリ性領域でのイオン交換クロマトグラフィーが良好な結果を示し、またブタミルクからのカゼインの分離には、ウシの場合と同様に塩酸の方が好ましく、陰イオン交換クロマトグラフィーで多数の成分が分離され、多岐にわたる遺伝的変異体の存在が示唆されたという。さらに、ウシラクtofフェリンを乳腺で発現するトランスジェニックラットのミルクからラクtofフェリンを分離するモデルを組んだ。すなわちウシラクtofフェリンを溶解したラットミルクから改めてラクtofフェリンを分離した結果、イオン交換クロマトグラフィーではほぼ純粋なラクtofフェリンが得られたが、回収率の点ではなお改善の余地があるという。

次に演壇に立った Yu, Dae-Yeul (KRIBB) は、1996年1月から2カ月間にわたって筆者の研究室に滞在して、生理活性のあるミルクタンパク質に関する共同研究を行っていた。本講演ではラット β -カゼインとヒト成長ホルモンの融合遺伝子を用いたトランスジェニックマウスを作出し、そのミルク中へヒト成長ホルモンを分泌させるのに成功した例を報告した。このトランスジェニックマウスの分泌するミルク中にはヒト成長ホルモンが $5500 \pm 620 \mu\text{g/ml}$ 含まれ、かつノーザン・プロット法で主に乳腺組織で効率的に発現していることを確かめた。また、ラット β -カゼインのプロモータ部分がヒト成長ホルモンを泌乳時期に合わせて発現させること、さらにヒト成長ホルモン遺伝子の3'フランキンク配列が効率的発現にとって重要であることを指摘した。

ついで島崎が座長をつとめ、トランスジェニック植物におけるラクtofフェリン関連物質のクローニングと

発現に関する研究が日韓双方から発表された。まず、高瀬研二(農水省農業生物資源研究所)はトランスジェニックタバコにおけるミルクタンパク質、特にヒト α -ラクトアルブミンとヒトラクtofフェリンの遺伝子の導入を *Agrobacterium tumefaciens* を用いて行い、それらの発現を行った成果について述べた。 α -ラクトアルブミンはトランスジェニックタバコの葉の可溶性画分に見出され、SDS-電気泳動による移動度もミルクから分離した α -ラクトアルブミンと全く同じであり、シグナルペプチドが間違いなく外れていた。これを DEAE-Sepharose クロマトグラフィーで精製し、乳糖合成系でチェックしたところ十分な活性を示したという。また、乳腺 cDNA ライブラリーからヒトラクtofフェリンの塩基配列を調べたところ、これまでに報告されているものと2カ所が異なっている (11A \rightarrow T, 29K \rightarrow R) ことを見出した。さらにヒトラクtofフェリンの一部であるN-末端に近い活性ペプチド「ラクtofフェリシン®」に対応する部分を直接に遺伝子から切り出して調製し、タバコに導入したところ、ラクtofフェリシンの発現がウエスタン・プロット法で確認された結果も述べた。

Liu, Jang R. (KRIBB) は、ヒトラクtofフェリン遺伝子を組み込んだトランスジェニックタバコを作出した成果を発表した。生育したトランスジェニックタバコの葉から酵素を用いて分離したプロトプラストには、ほとんどラクtofフェリンは見出されなかったが、葉の組織自体には高レベルでラクtofフェリンが含まれていることがウエスタン・プロット法で認められ、細胞壁にラクtofフェリンが分泌されていることが確かめられた。さらに画期的なことに、ヒトラクtofフェリンを発現したこのトランスジェニックタバコは、キュウリモザイクウイルスの感染に対して強い抵抗性を示したという。

午前の部の最後は、豊田裕(帯広畜大・原虫病分子免疫研究センター)の座長のもと、Lee, K.-K.によるヒトラクtofフェリンをミルク中に分泌するトランスジェ



写真2 迫力のある講演発表(豊田)の様子。

ニック動物の作出成果に関する発表であった。ウシ β -カゼインのプロモータを用い、かつヒトラクトフェリン発現レベルを向上させるために、発現ベクターの中に人為的に2個のイントロンを導入するなどしてトランスジェニックマウスを作成した。20系統のトランスジェニックマウスが作られ、ヒトラクトフェリンはミルク中に1~200 μ g/mlの濃度で分泌したという。ヒトラクトフェリン mRNA はトランスジェニックマウスの乳腺にだけ見出され、また正常にエクソン/イントロン連結部で切断されていた。さらにヒトラクトフェリンをそのミルク中に分泌するトランスジェニックウシを作出するために、目的DNAを導入した受精卵を51頭に移植したところ7頭の仔牛が生まれ、現在はそれらからさらに仔牛を作っているという。その他に、妊娠率が最良となるためのDNA導入技術と胚の培養条件を確立したことについても述べた。

4. トランスジェニック動物の バイオテクノロジー

引き続き午後の部は主に「トランスジェニック動物のバイオテクノロジー」に関する講演が行われた。座長・Liu, J.-R.のもと、まず上田純治(北大・農)が有用標識遺伝子のクローニングと物理的マッピングに関するこれまでの研究成果を発表した。染色体上の連鎖マーカー遺伝子としてマイクロサテライト多型は最も役に立つ標識遺伝子として注目されている。そこで特にブタのマイクロサテライトを非RI的に簡単にクローニングする方法を開発し、さらに比較的短い塩基配列の物理的マッピングが可能であるPRINS法によるブタの反復配列への応用例を示すと共に、この方法をマイクロサテライトに応用する可能性についても言及した。

鈴木啓太(北大・農場)は、トランスジェニックブタの作出を目指した体外受精系についての研究成果について発表した。精子の受精能獲得のための前培養の条件について検討した結果、採取した雄ブタあるいは前培養時間の違いにより体外受精率に差が見られたが、前培養を行わない場合にも高率に受精する例が観察された。また、種々の受精現象を解析するためには、完全合成培地を用いた体外受精系が望ましく、さらに培養液に一般的に添加するBSAを除いて体外受精を行っても受精が見られた。しかし、BSA無添加培地を用いた場合の受精率は、添加培地を用いた場合に比較して低率であった。そこで、BSA無添加培地を用いた場合に、受精時の精子濃度を高めることで受精率を向上させるのに成功したと報告した。

次いで上田(北大)座長のもと、Han, Yong-Mahn(KRIBB)が韓国在来種のヤギを対象とした胚発生に関する研究成果を発表した。ヤギ卵管上皮細胞と共培養したDNA挿入胚のin vitroでの発達状態を、共培

養しない場合と比較検討した結果、胚から桑実胚への分化においては差は認められなかったが、胚盤胞への分化の割合は65.6%と、ヤギ卵管上皮細胞無しで培養した時の12.0%よりはるかに高かった。ウシ β -カゼイン/ヒトラクトフェリン cDNA 融合遺伝子を導入したヤギ胚が、桑実胚および胚盤胞へ分化する割合はそれぞれ82.9, 36.6%であり、いずれも共培養の有効性を示し、正常な分割胚盤胞へと分化したという。この韓国原産のヤギの由来や現在の飼育状況についての詳細は不明だが、古くから人々は薬用として珍重してきたということである。また、演者は1993年から2度にわたり帯広畜大(福井研究室)に滞在していたことがある。

森匡(北大・農)は、マウスで一卵性双仔の発育パターンを観察した結果を報告した。2細胞期で割球を分離した分割胚由来のマウスの成長を、正常胚由来マウスに比べると、オスでは2-4週で体重が下回ったのに対し、メスでは成熟期において減少した。このような割球分離やその他の操作が、その後の成長に生理的な影響を及ぼすという観察は、例えばクローンウシの核移植の場合に生じている巨大仔などの、現在直面している多くの問題の解決にとって、何らかの糸口を与える可能性があると思われる。

Yu, D.-Y.座長のもとLee, Hoon Taek(建国大学)が、遺伝性光レセプター退化症の研究のためのトランスジェニックマウスの作出に関する研究成果を発表した。常染色体優性遺伝性の色素性網膜炎患者のロドプシン(分子量約4万の11-cisレチノールを発色団とする色素タンパク質)においては、Pro23と347とに変異が観察されており、臨床的にはPro23での変異の方が一般的にあまりひどい症状ではないという。そこでPro347をSerに変えたロドプシンを有するトランスジェニックマウスを作ったところ、外核層に含まれる桿状細胞の数が、4~20週で加齢に伴って37-90%と徐々に減少した。トランスジェニックマウスの網膜中のロドプシンの損失は光レセプターを含む列の数が減少することと強く関係しており、これは347番目のアミノ酸に相当する塩基の転換が、ヒトの視力減退の主な原因である退化性の不調を引き起こしていることを示唆しているという。

講演会の最後は上田正次(YS研究所)座長のもと、我が国のトランスジェニック動物研究の第一人者である豊田裕(帯広畜大)がトランスジェニック動物作出のための新しいアプローチに関する発表を行った。受精卵に外来遺伝子を導入するために現在用いられているマイクロインジェクション法は、前核にDNAを微量注入する方法であるが、挿入される染色体上の位置やコピー数を制御することが出来ないなどの制約がある。そこでこの方法に代わる画期的な方法として、アデノウイルスをDNAの運搬役として用い、マウス受

精卵の遺伝物質の中に直接 DNA を導入する方法を開発した。この新しい方法では、処理をした 27 匹のマウスの内 3 匹で遺伝子導入に成功し、かつその内の 2 匹が LacZ レポーター遺伝子を発現したことを確かめた。さらに得られたトランスジェニックマウスからは安定的に遺伝子を保持した子孫も生まれているということで、この方法の今後の活用が大いに期待されるものである。

なお、韓国からもう一人、Yoo, Ook Joon (Korea Advance Institute of Science and Technology) が参加する予定であったが、やむを得ない事情で来日出来ず、論文の寄稿のみにとどまった。それによると、再発性血栓症の患者から見出されたアンチトロンビン (トロンビンを不活性化するタンパク質) の一部の塩基配列が T から C (Phe368 → Ser) に変異しているため、疎水性の接触部分に変化してトロンビンと結合する能力を損なったものであるとの興味ある内容であった。

5. エクスカーション

翌 10 月 12 日 (土) は、27 名が参加して苫小牧市植

苗にある雪印乳業(株)受精卵移植研究所を訪問した。ここは本セミナーのメインテーマであるトランスジェニック動物作出に非常に関連深い、ウシの受精卵(胚)移植や体外受精を商業レベルで行っている研究所である。まず永井政僖所長による研究所の事業内容の紹介が行われた。この研究所は 1981 年に別海町にて産声を上げ、その後長沼町に移り、1986 年に現在地での活動を開始したとのことである。設立の主目的は、ウシ受精卵移植の普及と発展に寄与することと、研究・技術開発によって事業としての発展を図ることであり、現在の所員は 24 名で、研究開発、酪農家・畜産農家への受精卵移植事業、和牛増殖、受卵牛・供卵牛の管理などの事業を行っているとのことであった。その後、研究所で行われている主なテーマについて各研究担当者から英語で説明を受けた。長尾慶和は研究所で開発されたウシの体外受精に関する成果について発表し、さらに形質転換ウシ作出の先駆的な試みに関する成果も報告した。さらに高倉良と岸昌生は、クローンウシ作成を目指したウシ胚内部細胞塊 (ICM 細胞) に由来する胚性幹細胞樹立の試みに関する研究の成果を発表した。



写真 3 雪印乳業(株)受精卵移植研究所にて、永井所長の説明を聴く。前列向かって左側が韓国 Lee 代表。



写真 4 受精卵移植研究所の前で、エクスカーション参加者の記念撮影。



写真5. レセプションにおける交流風景. 日韓両国の研究環境やさらには今後の研究協力について活発な意見の交換もあり、かつ和気あいあいの内に閉会した。

発表の後、日韓セミナーの全日程が終了したことをうけて閉会が宣言され、また韓国側の Lee 代表から永井所長に交流を記念したプレゼントが贈られた。建物内の研究施設見学に続いて牧場を見学しながら様々な話しを聞いたところ、ホルスタインおよび黒毛和種合わせて800頭以上を飼育しており、非常に省力的かつ効率的に管理しているとのことであった。また、ウシICM細胞を用いたクローンウシ作成の成果として、8月に生まれたばかりの仔牛を見ることが出来た。家畜繁殖学関係のバックグラウンドを持つ参加者が比較的多かったためもあり非常に関心が高く、また特に韓国からの参加者の質問もかなり活発であった。我が国ではこの分野におけるトップグループの一つである企業研究所の研究内容を見せて頂いたことは、主に大学や国立研究機関に所属している日韓両国の参加者にとっては特に有意義な行事であった。

6. セミナーを終えて

今回、日本側研究グループの発表は比較的基礎的な研究が主体であり、一方、韓国側研究グループはかなり具体的あるいは応用的な研究が多かったといえよう。日本には様々な研究グループがあり、我々の研究グループが我が国の研究状況を反映している訳ではない。しかし、韓国側については、現在の韓国のこれらの分野をリードしている研究グループの発表であり、日本側にとって非常にインパクトの強い、かつ収穫の大きなセミナーであった。

また、日韓両国における研究環境の相違、特に法的な規制について参加者の関心が特に深かった。例えば、ウシなどの大動物を対象として形質転換する際の環境・施設整備が非常に困難で、研究の遅れを招いていることが話題となった。この様な研究環境の法的な面

をも含めた整備や、倫理的な面での検討についても、本セミナーの企画段階ではテーマとして挙げてあったが、時間的余裕のために次回以降に持ち越された課題である。

さらに本セミナーの当初の開催趣旨は、比較的小さい研究グループでの日韓の研究交流を目的とするということであった。日韓両研究グループ間のこれまでの細い線としての研究交流が、今回のセミナーにおいて広い面での情報交換へと進展し、非常に有意義な催しであったとの日韓双方の認識から、さらに今後も定期的にセミナーを開催しようとの計画が話し合われた。

また、日韓2カ国とはいえ国際セミナーなので、共通語である英語での発表で頑張らなければならないと若い講演者達にハッパをかけた。その期待に十分応える活躍がみられたことは、今後の研究活動においても期待できるものと、非常に心強く感じられた。また、このセミナーに携わった筆者ら一同にとっては、発表経験の面だけではなく、国際的セミナーの開催のノウハウを得る面でも、非常によい経験となった。

あとがき

本文中に於いては敬称を省略させて頂いた。また、記載の内容について、記憶違いや理解不十分のために、不正確なあるいは間違った記述があると思うが、それらは全て筆者の責任でありお詫びします。最後に、本セミナーの準備、当日の運営、後始末あるいはエキスカージョンの手配、写真撮影・記録など、我々にとって初の二国間行事主催の裏方を勤めてくれた三河勝彦、三浦千春、山田雅美、森ゆうこ、そして会場運営などに協力してくれた学生諸君に、紙面を借りて感謝します。