

NIBS LETTER 2010 MARCH  
No. 561

# 日生研おより

2010年(平成22年)3月号 第56巻第2号(通巻561号)

## 挨拶・巻頭言

情報収集

.....布谷鉄夫(2)

## 獣医病理学研修会

第49回 No. 980 ブタの回腸

.....(財)日本生物科学研究所(3)

第49回 No. 993 イヌの皮下腫瘍

.....北海道大学比較病理学教室(4)

## レビュー

体細胞クローン技術を用いた遺伝子組換え  
ブタの開発と利用

.....大西 彰(5)

ニワトリ乳酸脱水素酵素 A サブユニット

遺伝子(LDH-A)プロモーター領域の解析

.....勝俣 淳(8)

## お知らせ

ホームページのドメイン変更

について.....(12)

編集後記.....(12)



NIBS

財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

<http://nibs.lin.gr.jp/>

## 情報収集

布谷 鉄夫

春暖の候、皆様におかれましてはいよいよご清適の御事と拝察申し上げます。今冬は当初予測に反し降雪の多い寒い日々が続きましたが、梅花も盛りを迎え桜花もほころび始めました今日この頃です。此処青梅は市民マラソン発祥の地でもあり、今年も1万5千人近くのランナーが全国から集い、先行き不透明な社会不安を払拭しながら一つゴールを目指して健脚が競われました。

年々、時の流れを短く感じるような昨今であります。同様に感じておられる読者もおられるかと思いません。一説によれば、これは主観的に記憶される年月の長さが経験の少ない年少者にはより長く、経験豊かな年長者にはより短く評価されるという心理学的な現象（ジャンネーの法則）と解釈されているようです。しかし、筆者自身はその他にも近年のインターネットの普及と氾濫する情報の影響を少なからず受けているような気がします。毎日出勤するとまず机上のパソコンの電源を入れ、電子メールをチェックするのが日課となっております。日々配信されてくるその多さに開封するのが億劫になることも屡々あります。コンピュータシステムやインターネットなどの情報インフラが進み、あらゆる情報のやり取りが瞬時にして可能になっていますが、これら情報社会基盤の普及は電話や手紙のような個人対個人との人を介した情報交換から電子メールやブログなどに見られる個人対（不特定）多数とのコミュニケーションを可能にしました。それにより我々の日常業務は大幅に迅速・効率化するとともに、生活基盤そのものが急激かつ大きく変容しています。その便利さとは裏腹に、他方では個人情報流出や最近ではグーグルへのハッキングに見られるような情報社会基盤の脆弱性を脅かす様々なサイバー犯罪も増加しているようです。情報インフラの恩恵をもっとも身近に感じる一例が文献検索です。以前は図書室に足を運んで目的の書物を探し出しコピーをとって持ち帰るといった、ややもすれば時間単位の作業であったものが、現在では机上で指を動かすのみの分単位の作業でこと足り、労せず目的を達することが可能になりました。このような学術情報の収集は我々にとっては専門領域のフロントラインを把握し、また研究の方法論や経験則を補う手段としても欠かせない作業の一つであり、そのために割く労力の減少は研究遂行の効率化に大いに役立っています。一方、ネット情報は過去の出来事であり、それらは情報として発信された時点で固定され過去のものとなる；例えば今我々がネット上で調べている情報は全て過去の遺産であって、それらを毎日情報収集と称して追い求め一喜一憂していると仮定すれば、過去に向って全力で生きていることになる；つまり後ばかり見ていれば前が見えなくなり、従って、未来が見えなくなって不安でしよがなくなる（養老猛著「ネットの中にあるものは全て“過去の遺物”」）。この考え方を筆者なりに解釈させていただければ、情報を集めて目を通せば自らが経験したかのような錯覚に陥り安心してしまふことがあってはならない、新しい情報（過去の遺産）ばかりを追って一喜一憂せず足元もしっかりと見据える、未来の情報はネットに在らず現場に在る、と云うことでありましょうか。

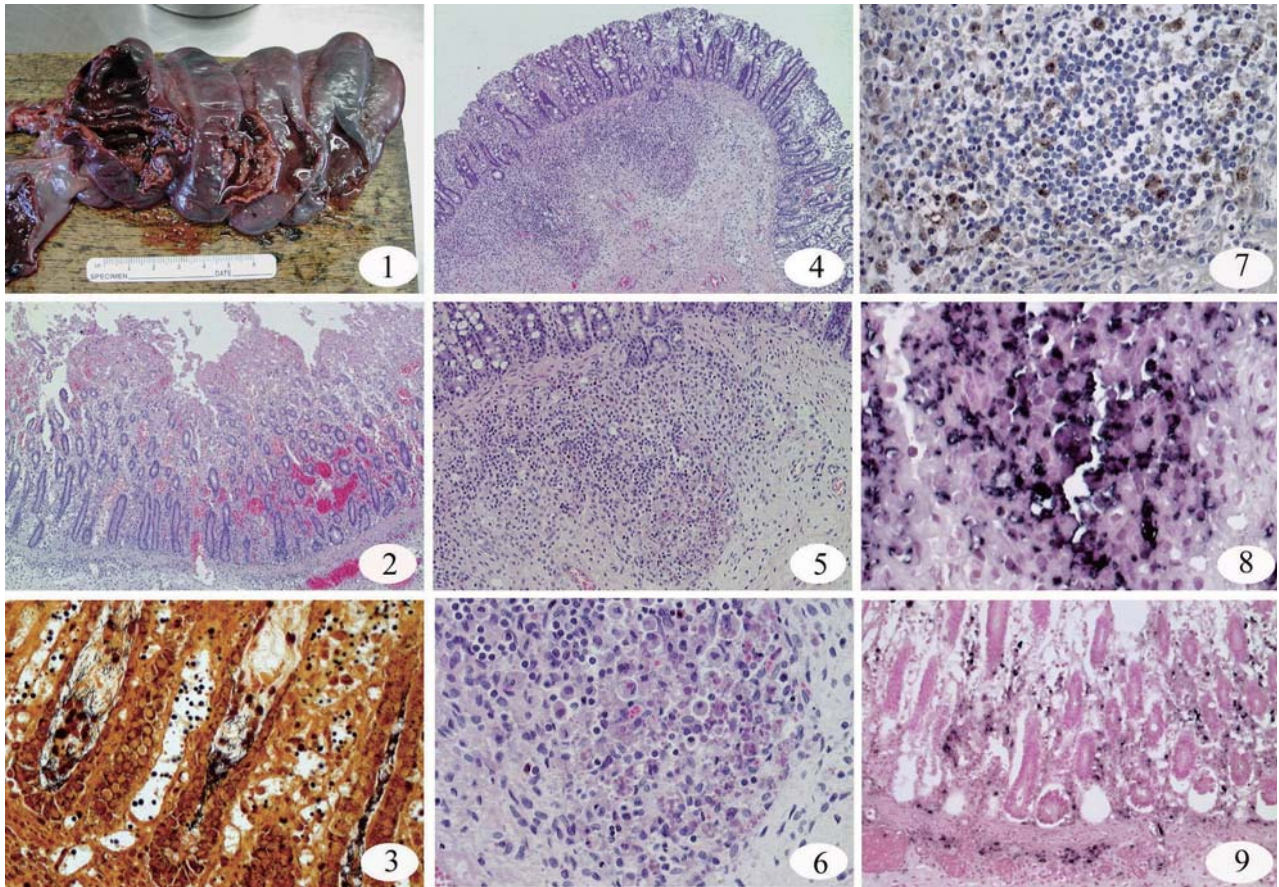
最近、米国で起きた日本車のリコール問題に関連した経営者による会見での、「会議室で報告書やデータで物事を判断するのではなく、実際に現場を見ることで初めて顧客の視点から判断できると確信している」との言葉は印象的でありました。有為転変する社会状況の下で発生する諸問題、とりわけ現場で今何が起きているか、何が求められているか、についての生の情報を得るためには視線を絶えず現場に向けながら行動する必要があると自らを戒めております。溢れる情報の中から必要不可欠且つ正確な内容を効率よく選択する作業は無論のこと、“過去の遺物であるネット情報”と現場に在る生の情報をバランスよく収集し活用していくことが大変重要であると思っております。

(所長)



## ブタの回腸

(財) 日本生物科学研究所 第 49 回獣医病理学研修会 No. 980



動物：ブタ，約 50 日齢，品種及び性別は不明。

臨床事項：鹿児島県の A 農場で，2007 年 10 月頃より 45 日齢以降の豚で下痢が見られ，60 日齢頃から死亡が目立つようになった。豚の死亡は 2007 年 12 月頃がピークで，30% 以上に達したが，その後は回復傾向を示した。検体は病性鑑定目的で 2008 年 1 月 31 日に A 農場で採材され，十二指腸から直腸までの腸管のみが 2 月 1 日に当所へ冷蔵された状態で到着した。

肉眼所見：腸管は十二指腸から直腸まで黒褐色を呈し，腸壁は菲薄化していた。腸管内には黒茶色の液状便が中等量認められた (図 1)。

組織所見：結腸では，粘膜面の壊死および出血，粘膜固有層でのリンパ球およびマクロファージの浸潤が観察され (図 2)，陰窩の内外には細長いらせん菌が散在し，それらはワーチンスターリー染色で黒く染め出された (図 3)。回腸では，粘膜の絨毛は消失し，パイエル板リンパ球の減少とマクロファージの浸潤が観察された (図 4, 5)。マクロファージの細胞質内には好塩基性の封入体が観察され (図 6)，2 型豚サーコウイルス (PCV2) に対する免疫染色で陽性を示した (図 7)。PCV2 に対する *in situ* ハイブリダイゼーションでは，免疫染色の結果よりもさらに多数の陽性シグナルが回腸粘膜下織の細胞集簇 (図 8) のみならず，粘膜固有層の浸潤細胞に

おいても観察され，さらに結腸でも同様な部位の浸潤細胞に陽性シグナルが少数認められた (図 9)。

診断：肉芽腫性回腸炎および壊死性出血性結腸炎

考察：結腸で観察されたらせん菌は細菌検査が未実施のため鑑別不能であったが，それらの形態と細胞外に存在することなどからブラキスピラ属の細菌を疑った。PCV2 に関連した腸炎では，ローソニアやブラキスピラ属の菌種との重感染についての症例や調査報告が多数発表されている [1, 2]。病理組織学的診断は上述の通りであるが，疾患名としては，腸管以外の臓器の検索を行っていないものの腸間膜リンパ節にも PCV2 のウイルス封入体が観察されることから，豚サーコウイルス関連疾患 (PCVAD) に相当すると考えられる。

(上塚浩司)

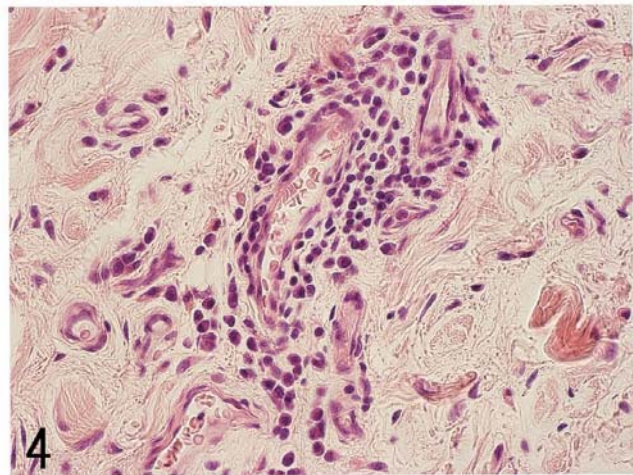
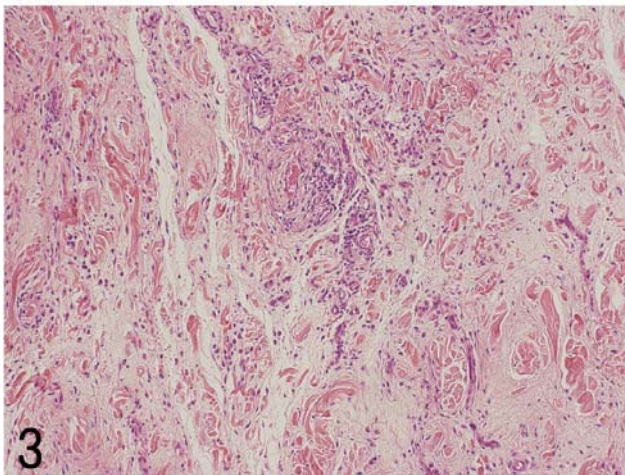
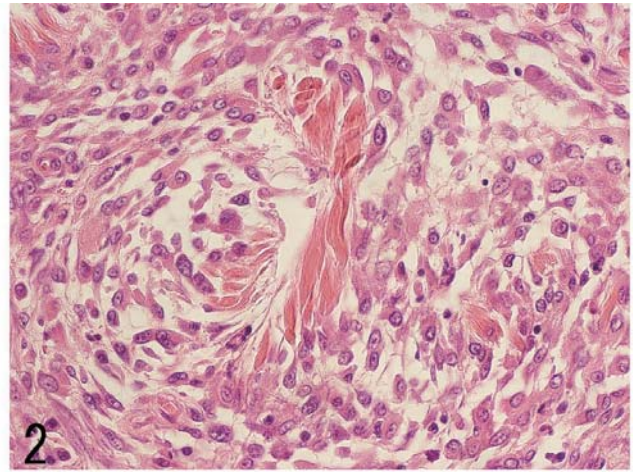
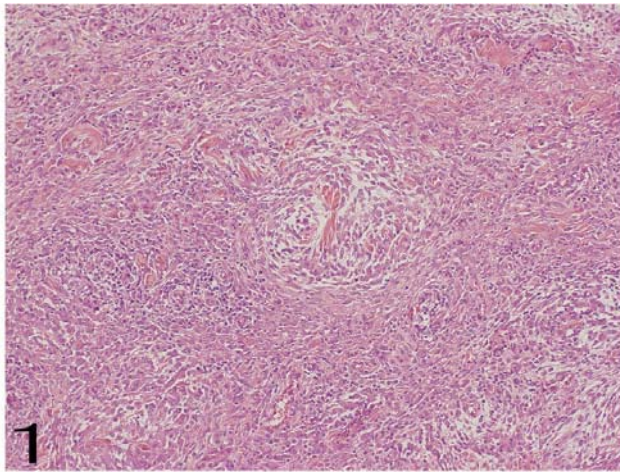
参考文献：

1. Jensen, T. K., Vigre, H., Svensmark, B. and Bille-Hansen, V. 2006. Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J. Comp. Pathol.* 135:176-182.
2. Komarek, V., Maderner, A., Spargser, J. and Weissenböck, H. 2009. Infections with weakly haemolytic *Brachyspira* species in pigs with miscellaneous chronic diseases. *Vet. Microbiol.* 134:311-317.



## イヌの皮下腫瘍

北海道大学比較病理学教室 第49回獣医病理学研修会 No. 993



**動物：**イヌ、バーニーズ・マウンテン・ドッグ、雄、9歳。  
**臨床事項：**本症例は約半年前より左前肢に軽度の跛行があり、1週間前より左前肢を挙上するようになった。触診により左肘関節の腫脹、X線検査により左肘関節に骨吸収像と関節炎を疑う所見が認められた。血液検査では白血球数の増加、関節液中には好中球を主体とする炎症性細胞が認められたが、関節液の細菌培養検査の結果は陰性であった。関節洗浄および増生した滑膜の切除生検が行われ、その際、左肘関節付近の皮下に存在した腫瘍も同時に摘出された。提出標本はこの皮下腫瘍より作製された。

**肉眼所見：**皮下腫瘍は左肘関節に隣接して存在していたが、関節腔との連続性は明らかではなかった。皮下腫瘍はやや硬度を有しており、その断面は白色から桃白色であった。

**組織所見：**腫瘍は多数の炎症性細胞の浸潤によって構成されており、膠原線維の変性、断裂を伴っていた(図1)。マクロファージを中心とする炎症性細胞の多結節性増殖が認められ、結節の中心部にはしばしば変性した膠原線維が存在し、その周囲を上皮細胞様のマクロファージが柵状に取り囲む像が認められた(図2)。また腫瘍の辺縁部では軽度の水腫および粘液の沈着が認められ、リン

パ球・形質細胞の血管周囲への浸潤も観察された(図3, 4)。

**診断：**柵状肉芽腫 Palisading granuloma

**考察：**提出標本中に認められた組織所見は、成書に記述されている柵状肉芽腫の特徴に一致した。柵状肉芽腫は単発性の皮膚結節性病変として、大型犬に多く発生する傾向がある。しかし、その報告数は少なく、原因および病理発生の詳細は不明である。本症例では単核球浸潤を伴う関節炎が認められたことから、犬のリウマチ様関節炎およびリウマチに関連した皮下結節である可能性を考慮したが、リウマチ因子が陰性であったこと、関節炎が単発性であったことから臨床的にはリウマチは否定的であった。浸潤細胞の大部分は豊富な細胞質を有する類上皮細胞であり、細胞の異型性や有糸分裂像が観察されないこと、細胞の増殖形態などから腫瘍の可能性を除外した。

(寸田祐嗣)

**参考文献：**

1. Gross T. L. *et al.* 2005. pp 337-341 *In: Skin Diseases of the Dog and Cat*, 2nd ed. Blackwell.
2. Lee M. W. *et al.* 1999. *Clin. Exp. Dermatol.* 24:193-195.



# 体細胞クローン技術を用いた遺伝子組換え ブタの開発と利用

大西 彰 (独立行政法人農業生物資源研究所遺伝子組換え家畜研究センター)

## 1. はじめに

ブタは、これまで長い歳月をかけて育種改良され、その高い生産性から食肉用の家畜として欠かせない存在になっている。一方、ブタは解剖学および生理学的にヒトとの類似点が多く、実験動物としての利用も進められてきた。実験用ブタに対しては、食肉生産のための高い発育能力と大型化とは異なり、扱いやすさに重点を置いた小型化が求められる。そのため、実験用ミニブタの開発が、食肉用とは別途に進められてきた。近年、動物愛護運動の高まりから、実験用イヌの利用が大きく制限されるなか、イヌに代わる実験動物としてブタが注目されている。しかし実際には、実験用ブタの利用は必ずしも進んではない。その理由として、ブタが取り扱える施設や技術者の絶対的な不足など、多くの問題点が挙げられるが、一つには、遺伝子組換え技術がブタでは未発達で、例えば疾患モデルの開発が困難な点にあったのではないかと考える。遺伝子組換えマウスの需要が年々増加することからも明らかなように、実験動物としての汎用性を増すためには、任意の遺伝子組換え技術が必要不可欠である。ブタにおける任意の遺伝子組換えは、これまでは技術的にほぼ不可能であった。しかし、その状況は、体細胞クローン技術の発展により一変しつつある。本稿では、遺伝子組換えブタの現状を紹介すると共に、実験動物としてのブタの可能性を探りたい。

## 2. なぜ実験用ブタなのか

食と同様に医は、人間の福祉と健康に欠かせない。そして医学の発展には、実験動物が計り知れないほど大きな貢献をしている。感染試験による病因の解明および治療法の開発、薬物の毒性や薬効の評価など、病気を克服するのに不可欠な多くの知見が実験動物により得られている。特に小動物であるマウスでは、遺伝子組換え技術により人間の病態を再現する疾患モデルが数多く開発され、その利用は増加の一途をたどっている。

一方、実験動物としてのマウスの限界も指摘され

るようになってきた。小動物であるマウスが外科的治療法の開発に不向きであるの言うまでも無い。例えば、狭窄している冠動脈内へステントを設置し、血管を広げる手法の開発や訓練をマウスで行うことは不可能で、より大型動物であるブタが最適とされている。循環器系におけるヒトとブタの類似性の高さが、この分野でブタが選択される理由となる。また、最近では、内視鏡手術の訓練にブタが多用されるようになってきた。これらの利用は、大型動物として、ブタが生理学的、解剖学的にヒトと多くの類似点を持つために他ならない。

マウスの限界は、単に身体の高さだけではない。現在、遺伝子組換え技術により多くの疾患モデルが開発されているが、遺伝子組換えマウスが必ずしもヒトの症例を反映しないことが問題となっている。生活習慣病の一つに高脂血症があげられる。ヒトにおいては、高脂血症は動脈硬化を引き起こし、重症の場合には死に至る。遺伝子組換え技術により高脂血症モデルマウスの作出は可能だが、マウスは動脈硬化に対する抵抗性が強く、動脈硬化症の誘引は非常に困難である。一方、ブタは冠動脈の構造がヒトに近く、血中のリポタンパク質のパターンが最もヒトに近い動物である。実際、血中コレステロールである、VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) および HDL (high density lipoprotein) の各分画パターンを見ると、ヒトとブタの類似性が極めて高いことがわかる。マウスの場合、ヒトやブタの分画パターンとは異なり、LDL よりも HDL の値が高くなる。これは、マウスではコレステロールエステル転送タンパク質が欠損しているため、HDL のコレステロールエステルが、VLDL や LDL に転送されないためである。さらにブタでは動脈硬化が生じることから、リポタンパク質およびコレステロールの代謝に係わるヒトのモデル動物として、ブタはマウスよりも相応しいと考えられる。血管狭窄の治療法であるステントの開発にブタが有用であることは前述したが、もしもブタで高脂血症による粥状動脈硬化症が再現できれば、新薬やステントを含むヒトの治療戦略をそのままブタに外挿することができ、新たな治療法の開発が可能

となるに違いない。その他にも、例えば、癌研究において、発癌に関連する遺伝子の種類がヒトとマウス間で異なり、ブタがよりヒトに近いことが明らかになりつつある。実際、マウスの発癌モデルがヒトの症例を必ずしも反映しない問題があり、その解決にブタの利用が考えられている。また最近の動向として、トランスレーショナルリサーチへのブタの利用があげられる。具体的には、再生医療などの先端的医療の開発において、得られた基礎研究の成果を臨床試験に応用するためには、小動物の他、中～大動物を用いた試験が必須となってきている。その候補となる動物の一つに、ヒトとの類似性が多く見られるブタが取り上げられるようになってきた。

### 3. 遺伝子組換えブタ

ブタを実験動物、特にヒトの疾患モデルとして利用するためには、遺伝子組換え技術が欠かせない。ブタの遺伝子組換えは、体細胞クローン技術の開発により飛躍的に進展しているが、これまでの経過を述べる。

#### (1) 前核内注入法による遺伝子組換えブタ

従来、遺伝子組換えブタの作出には、受精卵の前核内に直接にDNAを注入する、前核内注入法が用いられてきた。1983年、Palmiterらは、メタルチオネインをプロモーターとする成長ホルモン遺伝子をマウス卵子の前核内に注入した結果、誕生したマウスの成長が明らかに促進されたことを報告した。このいわゆる‘スーパーマウス’の誕生は、畜産分野でも注目され、ブタを用いた同様の研究がアメリカ農務省を中心に盛んに行われた。しかし、満足できる結果は得られず、成長促進が見られなかったばかりか、痩身、胃潰瘍、無性欲などの異常が多発した<sup>1)</sup>。成功率に関してみると、前核内注入法による産子の誕生率は約8%、遺伝子が導入された個体の誕生率で約0.7%、実際に遺伝子が発現した個体の誕生率は約0.4%と低いものであった。また、遺伝子の発現がみられた個体であっても、発現細胞と非発現細胞が入り交じるモザイクの状態となり、導入した遺伝子が生殖細胞を介して必ずしも後代に伝わらない欠点を有することが明らかになった。実験動物としてブタを利用するためには、任意の組換え体を得て、安定的に獲得した形質を後代に伝えることが必須条件となる。ブタの前核内注入法は、これらの点で全く実用性に欠ける技術であった。その後マウスでは、ES (embryonic stem) 細胞が作出され、相同遺伝子組換えによる遺伝子ターゲティングが

可能となり、特定の遺伝子座を破壊した、ノックアウトマウスが次々と開発されるようになった。近年、疾患モデルとして、これらのノックマウスの有用性は高まるばかりである。ブタの場合、ES細胞の作出に向けた数多くの研究がなされたが、実用性のあるES細胞は世界的にも得られなかった。ブタにおいて、任意の遺伝子組換え体を得る手段は、2000年の体細胞クローンブタの出現を待つより他になかった。

#### (2) 体細胞クローン技術による遺伝子組換えブタ

体細胞クローンブタの成功は、我々を含め、2000年に相次いで報告された<sup>2) 3)</sup>。ブタはウシと異なり多産なため、体細胞クローン技術による優良家畜の増産はほとんど意味を持たない。しかし、系統保存への活用は有効と思われる。ブタの生殖細胞、特に受精卵の凍結保存技術は不安定で必ずしも実用レベルに達していない。一方、線維芽細胞を代表とする体細胞の凍結保存は極めて容易で安定している。そのため、ブタの系統維持において最も懸念される近交退化や感染症汚染に対して、近交係数の低い、あるいは清浄なブタより体細胞を採取し凍結保存することは、体細胞クローン技術による個体再生が可能となった現在、不測時への備えとして有効な手段となるに違いない。しかし、ブタにおける体細胞クローン技術の最大の長所は、やはり遺伝子組換え体の作出に他ならない。

体細胞クローンの場合、細胞の段階で遺伝子の導入や発現が確認できることから、これらの細胞を用いて核移植をした場合、組換え体の成功率が飛躍的に向上される。培養体細胞への遺伝子導入に用いられる、発現ベクターあるいはノックアウトベクターには、通常、ネオマイシンやピューロマイシン等の抗生物質に対する耐性遺伝子が組み込まれる。したがって、これらの薬剤を培養液に添加することにより、遺伝子が組み込まれた細胞のみが生存し選択されることになる。しかし、遺伝子が導入されても、必ずしも発現するとは限らない。実際には、多くの細胞で遺伝子の発現は見られない。この解決策の一つには、FACS (fluorescence activated cell sorting) 解析による発現細胞の選択があげられる。導入した遺伝子の発現が細胞表面上に影響を及ぼす場合には、抗体等を用いて直接に細胞が選択できる他、細胞質内での発現の場合には、導入する遺伝子にGFP (green fluorescence protein) 等の蛍光タンパク質を連結することにより、間接的ながら発現細胞の選択が可能となる。我々は、FACS解析により導入遺伝子が発現した細胞のみを選択し、体細胞クローンに用いた結果、誕生した全てのクローンブタにおい

て導入遺伝子の発現が認められ、その有効性が極めて高いことを明らかにした。体細胞クローン技術の問題点の一つに、成功率が動物種にかかわらず約1%と低いことがあげられる。そのため、誕生した個体が確実に遺伝子組換え体であることの意義は極めて大きい。さらに、前核内注入法と異なり、体細胞クローンの場合にはモザイクが生じることがなく、獲得した形質を確実に後代に伝えることができる大きな利点を持つ。

### (3) 体細胞クローン技術による遺伝子ノックアウトブタ

マウスでは、ES細胞による特定の遺伝子座の改変が可能である。しかし、ブタではES細胞の作出ができず、同様の手法を用いることができなかった。相同遺伝子組換えの頻度は $1/10^6 \sim 1/10^7$ と低い。これだけ多数の受精卵を用意することは不可能なため、前核内注入法による遺伝子ターゲティングも、全く非現実的であった。一方、培養細胞の場合には、例えば、10 cm 大のシャーレで、 $10^6$  個の細胞を容易に用意することができる。体細胞の場合、ES細胞よりも相同遺伝子組換えの頻度がさらに低くなるとされているが、実際には比較的増殖速度の速い胎児由来の線維芽細胞を用いることにより、遺伝子ターゲティングは可能である (図1)。

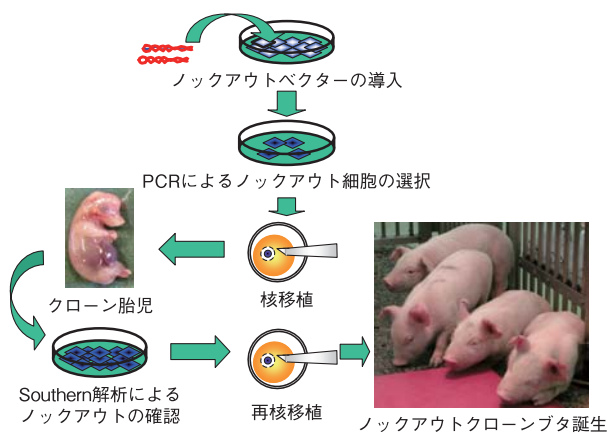


図1 ノックアウトクローンブタの作出法

体細胞クローン技術を用いた遺伝子ターゲティングに最も注目したのが、異種移植の分野である。ブタ臓器は、生理学的および解剖学的にヒトに類似することから、慢性的に不足しているヒト臓器の代換え利用が考えられている。しかし、ブタ細胞表面には、主要異種抗原である $\alpha$ Gal抗原が存在するため、ヒトへ移植した場合には超急性拒絶反応が生じてしまう。そこで、 $\alpha$ Gal抗原を発現させる酵素である、 $\alpha$ 1,3GT ( $\alpha$ 1,3galactosyltransferase) の遺伝子ノックアウトが考案された。欧米の2社のベン

チャー会社が、2002年に相次いで体細胞クローン技術を用いたヘテロの $\alpha$ 1,3GTノックアウトブタの作出に成功し<sup>4)5)</sup>、その後、ホモのノックアウトを経てヒトへの臓器移植が実行された。その結果、超急性拒絶反応の抑制効果は確認されたが、引き続き急性拒絶反応の問題が残った。我が国においても、我々を含む2グループで $\alpha$ 1,3GT遺伝子ノックアウトブタの誕生に成功している。

### 4. 我々の試み

前述のように、ブタは実験動物としての可能性を大きく秘めている。そこで、我々(農業生物資源研、理化学研、名古屋大学、(株)プライムテック)は2007年より、農林水産省委託プロジェクトにおいて医療用モデルブタの開発に取り組んでいる(図2)。同プロジェクトでは、臓器移植用、再生医療用、および疾患モデル用の3分野において、体細胞クローン技術と遺伝子組換え技術の併用による新たなブタの開発を行っている。疾患モデルとしては、生活習慣病および癌をターゲットにしている。プロジェクト以前に3種類の遺伝子組換えブタの作出に既に成功していたが、その後、3種類の遺伝子ノックアウトブタを含む、7種類の遺伝子組換えブタ(計10種類)を誕生させている。それら全ての詳細を述べる段階ではないが、異種移植研究に関連した遺伝子組換えブタに関して紹介したい。我々はGFP発現ブタ<sup>6)</sup>の成功に引き続き、異種移植を目的とする2種類の遺伝子組換えブタの作出に成功した。その一つは、補体反応を抑制するhDAF (human decay accelerating factor)を高発現するブタで、もう一種は異種抗原である $\alpha$ Gal抗原を特異的に切断する酵素、EndoGalC (endo- $\beta$ -galactosidase)を発現するブタである。両者とも、前述のFACS解析により発現細胞を選択し、体細胞核移植により誕生させている。特にhDAF発現ブタに関しては、FACSの利

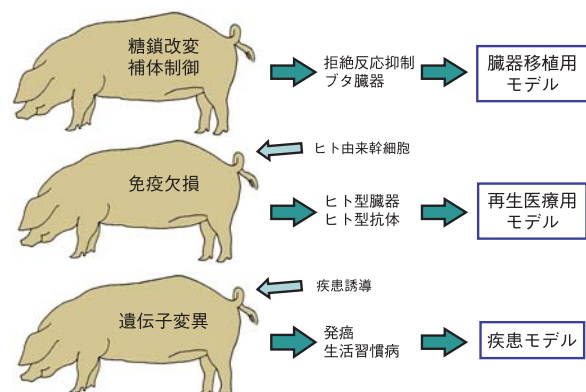


図2 開発中の遺伝子組換えブタ



用により、ヒトの30倍以上の発現量を持つ、他に例のないブタが得られている。次に、両者の交配により両遺伝子を保持するブタも誕生し、これらのブタから腎臓を摘出し、ヒヒへの移植を実施した。海外での報告では、強力だが臨床への利用が認可されていない免疫抑制剤や、予め胸腺の移植による免疫寛容を誘導した状態での異種移植試験が実施されている。我々は、臨床で用いられる通常の免疫抑制剤の使用下での移植試験とした。その結果、超急性拒絶反応は抑制され、ブタ腎臓はヒヒ体内で約1週間生着したが、その後の拒絶は免れなかった<sup>7)</sup>。EndoGalC発現ブタは、95%以上の $\alpha$ Gal抗原を切断除去するが、100%の除去は不可能である。そのため、次の段階として、100%の $\alpha$ Gal抗原の除去を可能とする、 $\alpha$ 1,3GT遺伝子ノックアウトブタの利用が必要となる。また、凝固系の抑制も不可欠なことから、抗凝固を目的とする遺伝子組換えブタも必要となる。我々は、既にその両者の遺伝子組換えブタを誕生させており、その有効性の評価が今後の課題となっている。

#### おわりに

我々の作出したブタは、いずれも食肉用の家畜ブタを用いている。遺伝子組換えブタの作出においては、体細胞クローン技術の成功率の低さを考慮すると、価格および繁殖性の点で有利な家畜ブタを用いざるを得ない。しかし、実験用としての普及には、ミニブタ化の必要性が生じる。また、実験用動物の基準に適した微生物制御の問題もある。これらの問題は、家畜ブタとミニブタとの交配により解決することができる。

実験動物としてのブタは、大きな期待が持たれる一方、決して普及は進んでいない。実験用ブタへの理解を深めるための普及活動が欠かせないが、農学関係者あるいは医学関係者が単独で行動しても解決できない。アメリカにおいては、医薬医療分野での新たなブタの需要拡大を見越し、農学分野と医学分野の橋渡しとなる、国立のブタ資源研究センター(National swine resource and research center)が2003年に設立された<sup>8)</sup>。同センターは、農学分野と医学分野の情報交換の場とし、実験用ブタの維持および配布を実施する他、遺伝子組換えブタの開発、ブタ胚の凍結保存技術の開発、微生物制御法の開発、遺伝子モニタリング技術の開発などを行っている。アメリカでの動向は、新産業創出に向けた新たな戦略と考えられ、日本においても同様の組織の設立が強く望まれる。

#### 参考文献

1. Pursel, V. G., Bolt, D. J., Miller, K. F., Pinkert, C. A., Hammer, R. E., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. 1990. Expression and performance in transgenic pigs. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **40**:235-245.
2. Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry, A. C. F. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* **289**:1188-1190.
3. Polejaeva, I. A., Chen, S. H., Vaught, T. D., Page, R. L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D. L., Colman, A. and Campbell, K. H. S. 2000. Cloning pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* **407**:505-509.
4. Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K. W., Cheong, H. T., Greenstein, J. L., Im, G. S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B. N., Murphy, C. N., Carter, D. B., Hawley, R. J. and Prather, R. S. 2002. Production of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knock out pigs by nuclear transfer cloning. *Science* **295**:1089-1092.
5. Dai, Y., Vaught, T. D., Boone, J., Chen, S. H., Phelps, C. J., Ball, S., Monahan, J. A., Jobst, P. M., McCreath, K. J., Lamborn, A. E., Cowell-Lucero, J. L., Wells, K. D., Colman, A., Polejaeva, I. A. and Ayares, D. L. 2002. Targeted disruption of the  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.* **20**:251-255.
6. Watanabe, S., Iwamoto, M., Suzuki, S., Fuchimoto, D., Honma, D., Nagai, T., Hashimoto, M., Yazaki, S., Sato M. and Onishi, A. 2005. A novel method for the production of transgenic cloned pigs: electroporation-mediated gene transfer to non-cultured cells and subsequent selection with puromycin. *Biol. Reprod.* **72**:309-315.
7. Yazaki, S., Iwamoto, M., Onishi, A., Miwa, Y., Suzuki, S., Fuchimoto, D., Sembon, S., Furusawa, T., Hashimoto, M., Oishi, T., Liu, D., Nagasaka, T., Kuzuya, T., Maruyama, S., Ogawa, H., Kadomatsu, K., Uchida, K., Nakao, A. and Kobayashi, T. 2009. Successful cross-breeding of cloned pigs expressing endo- $\beta$ -galactosidase C and human decay accelerating factor. *Xenotransplantation.* **16**:511-512.
8. Web site: <http://www.nsrrc.missouri.edu/>



## レビュー 2

ニワトリ乳酸脱水素酵素 A サブユニット遺伝子  
(LDH-A) プロモーター領域の解析

勝俣 淳

乳酸脱水素酵素 (LDH) は解糖系においてピルビン酸→乳酸を触媒する酵素として古くからよく研究されている。この酵素は、生殖細胞を除く体細胞では2種類のサブユニット (A 及び B サブユニット) からなるヘテロ 4 量体を形成し、各ヘテロ 4 量体 (A4, A3B1, A2B2, A1B2, B4) の比率は組織によって異なっている。LDH は各組織に多量に発現しているタンパク質であり、その発現量は転写レベルで調節されていることが知られている。したがって、タンパク質をトランスジェニック動物で大量に発現させる場合のよいプロモーターになることが期待される。一方、近年、解糖系の酵素について、いわゆる化学反応を司る酵素としての機能だけでなく、別の機能を持つという報告が多数なされている<sup>1)</sup>。LDH についても、LDH-A サブユニットが一本鎖 DNA 結合タンパクであること<sup>2)</sup>、LDH-B がアヒルで目のレンズの構成タンパクである e-crystalline と同じ遺伝子にコードされていること<sup>3)</sup> など、興味深い知見が報告されている。そこで今回、我々は

ニワトリ LDH-A サブユニットをコードする遺伝子のプロモーター解析を行った。

ニワトリゲノムから得られた LDH-A プロモーターを含むフラグメントの塩基配列を決定した (GeneBank Accession No. AB3818)。すでに報告されているヒト、マウス等のプロモーターと同じように、SP-1, AP-2, CREB などの転写因子の結合配列があり、また TATA-BOX がなく、G-C に富むといった典型的なハウスキーピング遺伝子のプロモーターの特徴があった。次に、ニワトリ繊維芽細胞から得た mRNA を鋳型に 5' RACE を行い、転写開始点を決定した。クローニングした cDNA の塩基配列を調べたところ、4 種類に分類されたので、clone 1-4 とした (図 1)。これらクローンのシーケンス解析から、スプライシング部位の異なるクローンの存在も明らかとなり、転写開始点およびスプライシングの異なる 4 種類の RNA が存在することがわかった。図中の clone 3, 4 については、G ク

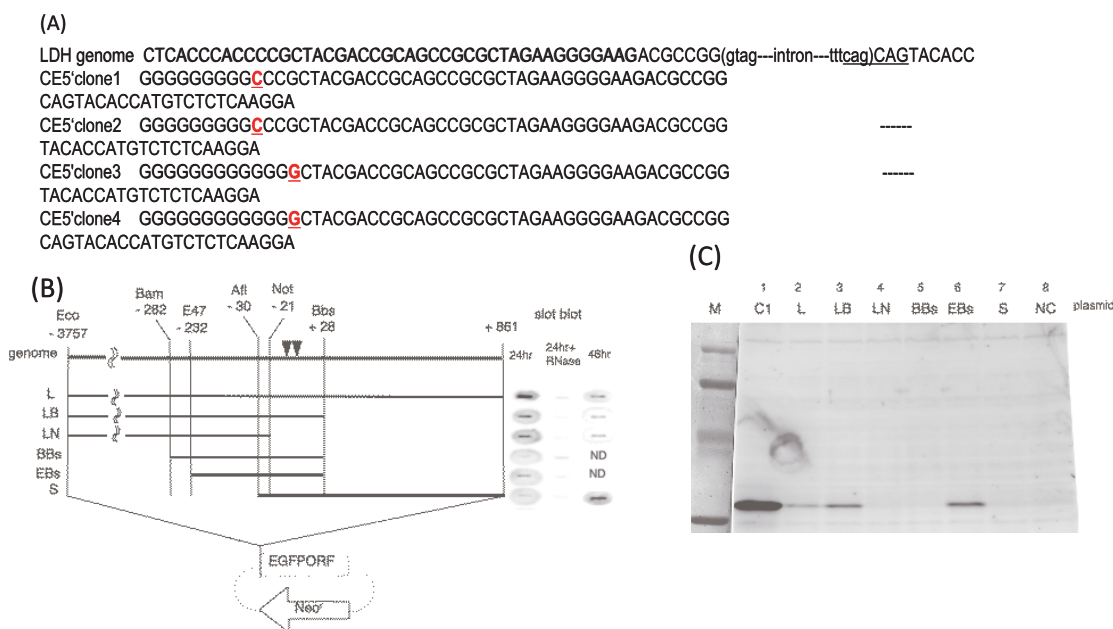


図 1 5' RACE クローンの塩基配列および LDH-A プロモーター領域の解析

- (A) ニワトリ繊維芽細胞から得た RNA を鋳型に 5' RACE を行った。4 タイプの 5' RACE クローンの塩基配列を示した。図中赤字の C および G は転写開始点、小文字はイントロンを示す。2 つの異なるイントロンの 3' 末端はゲノムシーケンス (最上段) にアンダーラインで示した。
- (B) プロモーター領域、deletion plasmid の図およびスロットプロットの結果。最上段にゲノムの構造、その下に各 deletion plasmid に含まれるフラグメント、各 plasmid 右にスロットプロットの結果を示した。図中 ND は実験を行っていない事を示す。
- (C) (B) に示した plasmid の抗 EGFP 抗体ウエスタンプロテイングの結果  
MW; マーカー, C1; pEGFP-C1, NC; トランスフェクションしていない細胞のサンプル

ラスターの最後の G が一連の反応中に付加された G なのか、鋳型 cDNA 由来のものであるかを確かめるため、5' RACE のヌクレオチド付加反応の基質を A に換え、前述と同様に 5' RACE を行った。ただ、これらのスプライシング部位の違いは、オープンリーディングフレーム (ORF) の上流に位置し、LDH の ORF の上流に翻訳開始コдонは見られない事から、コードされているタンパク質には影響はないと考えられた。

次に、転写開始点を含む、LDH ORF の翻訳開始コдон ATG の上流約 1,200 bp の領域について、図 1B に示すような deletion シリーズを作製し、EGFP の上流に繋いでプロモーター活性を調べた (図 1, B)。それぞれのプラスミドを HeLa 細胞に導入し、24, 48 時間後に RNA を回収し、EGFP 断片をプローブとしてスロットプロットを行った。

その結果、図 1B の plasmid BBs と plasmid EBs での RNA の発現量から、-282 ~ -232 bp (図中のヌクレオチドの番号は翻訳開始コдон ATG の A を +1 とした) には発現を抑制するシスエレメントがある事が示唆された。

一方、plasmid S においては 48 時間後にスロットプロットで特異的なシグナルが検出され、予想されたプロモーター領域を欠失した、すなわち、典型的なプロモーター配列を持たない S フラグメントにもプロモーター活性があることが判明した。一方、それぞれのプラスミドから EGFP タンパク質が生産されているのか、48 時間後に細胞を回収し、ウエスタンブロッティングで調べた (図 1C)。plasmid BBs と plasmid EBs での RNA の発現量と

EGFP タンパク質の発現量は相関していて、-282 ~ -232 bp の抑制エレメントの存在が確認された。驚いたことに、plasmid S では EGFP タンパク質が検出されず、タンパク質に翻訳されない転写が起きている事が示唆された。plasmid S は RNA の発現量も多い、すなわち、転写活性が強いのでこの領域の解析を行うことにした。

前述と同様に、plasmid S を導入した HeLa 細胞から RNA を調製し、5' RACE クローンを得た (図 2A)。クローンは 3 種類に分類され、それぞれ、通常のスタートサイト (S1), イントロン内 -42 (S2) および -52 (S3) から転写が起きている。

S フラグメントからの転写が *in vivo* でも起きているかを調べるために、鶏の心筋、骨格筋、およびふ卵 48 時間目の embryo から採取した RNA を鋳型に oligodT アダプタープライマーで逆転写し、3' RACE を行った。5' RACE で決定した上流プロモーターの転写開始点 (▼) の下流に作ったプライマー、LFH-START および第 1 イントロン内からの転写産物の 5' 末端 (▽) の下流に作ったプライマー、LDH -42 を用いてそれぞれの転写産物の区別をした。その結果、図 2B に見られるように、第 1 イントロン内からの転写産物 (レーン ST) が各組織に存在することが判明した。3' 側のプライマーは oligodT であることから、それらの RNA は polyA 付加を受けることが明らかとなった。すなわち、第 1 イントロン内にプロモーター (以降、近位プロモーター) が存在することが明らかとなった。

ところが、近位プロモーターには、RNA polymerase II のプロモーターの一般的な特徴が見



図 2 近位プロモーターの転写開始点および転写産物の解析

- (A) LDH-A genome と 5' RACE クローンと比較 HeLa 細胞に plasmid S をトランスフェクトしたサンプルから得られた RNA を鋳型にした 5' RACE の結果および、図 1 で 5' RACE で付加させるヌクレオチドを A に換えて行った 5' RACE の結果を示した。星印は genome およびクローン S2,3 間で、また、小さい点は genome とクローン S3 で配列が一致していることを示す。▼は上流プロモーターの転写開始点、▽は plasmid S をトランスフェクトした HeLa 細胞での plasmid S の転写開始点。LDH-START および LDH-42 は (B) で PCR に用いた 5' 側のプライマーを示す。
- (B) 心筋、骨格筋および 48 時間ふ卵後の embryo における下流プロモーターからの転写産物各サンプルから得られた RNA を鋳型に、oligo dT adapter プライマーで逆転写反応を行い、(A) に示したプライマーと oligo dT adapter プライマー内の配列に相補的な M4 プライマーを用いて PCR を行った。ST および -42 は PCR に使った 5' 側プライマーで、それぞれ (A) に示すプライマー、LDH-START と LDH-42 を示す。



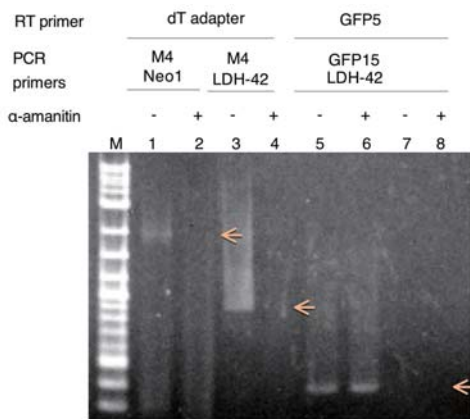


図3 in vitro 転写系を用いた近位プロモーターの $\alpha$ -amanitin 耐性転写活性の解析

In vitro HeLa 細胞転写系に plasmid S を加え、 $\alpha$ -amanitin の存在・非存在下で転写反応を行い、その転写産物を鋳型に PCR を行った。

レーン 1, 2 はプラスミド中に含まれる SV40 major late プロモーターで読まれる Neo 遺伝子について PCR を行ったもの (加えた  $\alpha$ -amanitin で pol II による転写が抑えられることを示している)。レーン 7, 8 は逆転写反応前に RNase を加えたもの。

られない。そこで、plasmid S を HeLa Cell in vitro 転写系に加え、転写活性の $\alpha$ -アマニチンに対する感受性を in vitro で調べた (図 3)。

転写反応後に RNA を抽出し、oligo dT アダプターで逆転写後、アダプタープライマーに特異的なプライマー M4 と LDH-42 で PCR を行い、polyA 付加される RNA を検出した (レーン 3, 4)。さらに、EGFP の ORF 内の 5' 側に作ったプライマーを用いて RT-PCR を行い、polyA 付加されない RNA も検出した (レーン 5, 6)。

その結果、このプロモーターから転写される RNA は 2 種類存在することが示唆された。一つは polyA 付加を受ける RNA で、これは 20  $\mu$ g/ml の $\alpha$ -アマニチンに感受性を示すことから、一般にタンパク質をコードする mRNA を転写する RNA polymerase II で転写されていることが示唆された。

もう一つは、 $\alpha$ -アマニチン耐性であることから RNA polymerase I または III によって転写され、おそらく polyA が付加されていない転写産物であることが示唆された。

次に、生体内での近位プロモーターからの転写活性をみるために、polyA 付加されない RNA をも検出できるように LDH の ORF 内の 100 base の位置にプライマーを作製し (図 4 中のプライマー LDH3-14)、先程と同じように心筋、骨格筋、ふ卵 48 時間後の embryo から得た RNA を鋳型に RT-PCR を行った。

その結果、LDH-A がほとんど発現していない心筋で近位プロモーターからの転写活性が強く、逆に LDH-A が盛んに転写されている embryo では上流

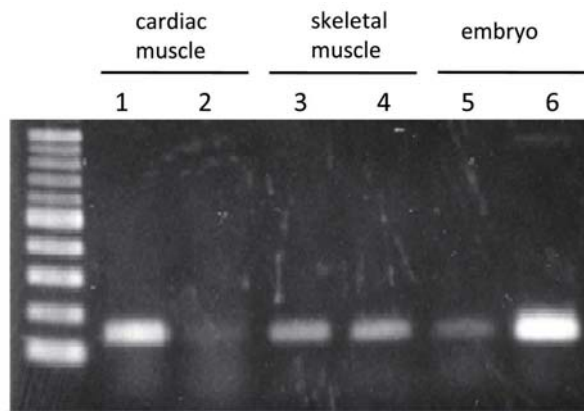


図4 心筋、骨格筋および embryo での上流プロモーターおよび近位プロモーターからの転写産物

各組織から得た RNA を鋳型に LDH-A ORF 内の上流 (+890) に設定したプライマー LDH3-7 で逆転写反応を行い、LDH3-14 (+861) と LDH-START または LDH-42 の間で PCR を行った。

プロモーターからの転写が盛んに行われ、近位プロモーターからの転写は弱い事が示唆された。

図 2 に見られるように polyA 付加される RNA の量は、embryo においても上流プロモーターからの転写産物に比べて多い様子はないことから、図 4 に見られた近位プロモーターからの転写産物由来の PCR 産物は polyA 付加されていない RNA 由来であると思われる。今回、ここには示さなかったが、近位プロモーターからの転写産物をダイレクト・シーケンシングし、得られた塩基配列をデータベースに照合したところ、機能不明のニワトリ RNA (GeneBank Accession No. AJ720887) と高い相同性があった。しかしながら、今回塩基配列を決定した LDH-A ゲノム領域 1,200 bp にはこれと相同性のある領域がなかった。

このことは、この配列が LDH-A 遺伝子の下流のイントロン中にコードされている可能性を想像させるが、まだ、その箇所を特定していない。

以上の解析結果を図 5 にまとめた。ニワトリ LDH-A 遺伝子には 2 つのプロモーターがあり、上流プロモーターには複数の転写開始点が存在し、報

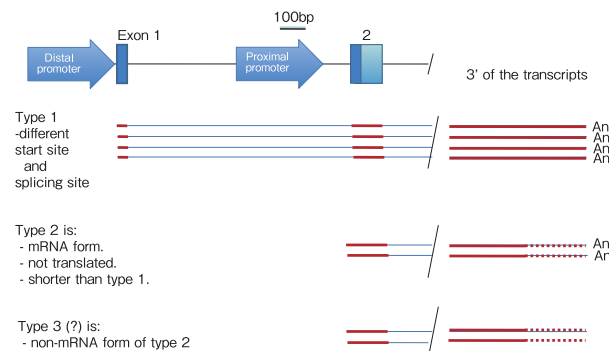


図 5

告されている通常のプロモータと考えられた。また、転写産物は ORF の上流で異なるスプライシングを受け、2 種類の mRNA になる。通常のプロモータ配列をもたない近位プロモーターから転写される RNA は 2 種類あり、一つは polyA 付加を受け、RNA polymerase II によって転写されるが他方は poly A 付加を受けず、RNA polymerase I または III によって転写される。また、近位プロモーターの転写活性は、LDH-A が転写されない心筋で強い。今回の解析では著者が思っていた程に LDH-A のプロモーターの活性は強くなかったが、近位プロモーターを欠損させる、あるいは転写に抑制的に働いているように思われる -282 ~ -232 bp の領域を欠損させる、他の遺伝子のエンハンサーを組み合わせる等の加工をすることで、強い転写活性のあるプロモーターを作れる可能性も残っている。サイトメガロウイルス IE プロモーターに見られるように、ウイルス由来プロモーターがゲノムに組み込まれると

メチル化等の修飾を受け不活性化される現象があることを考えると、トランスジェニック動物作製の上で、強い転写活性を示すゲノム由来プロモーターを作ることは有意義であると考えられる。また、今回の解析で明らかとなった近位プロモーターの存在、その転写産物の生体内での役割など、興味深い点が残されている。かなり飛躍するが、今回解析した LDH-A のような解糖系酵素遺伝子のように、一見、解析し尽くされたようにみられる遺伝子でも、コードされている RNA、タンパク質が一種類か？ タンパク質の機能は複数ないか？ (1 遺伝子 1 酵素⇒1 遺伝子複数タンパク質？ 1 遺伝子複数機能タンパク質？) など、疑ってみる必要があるのかもしれない。(研究員)

1. J-W, Kim. 2005. *Trends Biochem. Sci.* **30**:142-150.
2. Cattaneo, A. 2000. *Exp. Cell. Res.* **161**:130-140.
3. Wiljan H., 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:7114-7118.

## お知らせ

財団ホームページの URL のドメインが“lin.go.jp”から“lin.gr.jp”に変更となります。

つきましては、以下の通り並行運用期間を設けた後、平成 22 年 3 月末日をもって、“lin.go.jp”の運用を停止する予定です。平成 22 年 4 月以降は“lin.go.jp”での利用ができなくなります。短期間ではありますが、ドメイン移行についてご理解いただき、ホームページのリンク先やブックマーク、メールアドレス等の変更についてもよろしくご対応をお願い致します。

①平成 22 年 3 月 31 日まで

<http://nibs.lin.go.jp/> ……………アクセス可

<http://nibs.lin.gr.jp/> ……………アクセス可

②平成 22 年 4 月 1 日以降

<http://nibs.lin.go.jp/> ……………アクセス不可

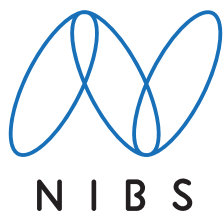
<http://nibs.lin.gr.jp/> ……………アクセス可

## 編集後記

日ごとに春の訪れを感じるようになってきましたが、皆様におかれましてはいかがお過ごしでしょうか。さて次年度より黒田丹、竹山夏実、鈴木敬之が編集にあたらせて頂きます。

読者の皆様におかれましては、季節柄どうかご自愛下さい。今後とも、引き続き日生研たよりを御愛読賜りますよう、宜しくお願い申し上げます。

(編集委員長)



—— テーマは「生命の連鎖」——  
生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士の揮毫

日生研たより 昭和 30 年 9 月 1 日創刊(隔月 1 回発行)  
(通巻 561 号) 平成 22 年 2 月 25 日印刷 平成 22 年 3 月 1 日発行(第 56 巻第 2 号)  
発行所 財団法人 日本生物科学研究所  
〒198-0024 東京都青梅市新町 9 丁目 2221 番地の 1  
TEL : 0428(33)1056(企画学術部) FAX : 0428(33)1036  
発行人 林 志鋒  
編集室 委員/竹山夏実(委員長), 入江拓也, 佐藤寛子  
事務/企画学術部  
印刷所 株式会社 精興社  
(無断転載を禁ず)