

シンポジウム

講演要旨

期 日：平成2年11月9日(金)

場 所：北海道大学学術交流会館

(札幌市北区北8西5 電話 011-758-5426)

日本農芸化学会北海道支部
北海道農芸化学協会

〒060 札幌市北区北9条西9丁目 北海道大学農学部
農芸化学科内 TEL011-716-2111 内線2497・2508

シンポジウム

「細胞の分化・応答と遺伝子」 —その応用への展望—

- 13:00 開会 日本農芸化学会北海道支部長 千葉 誠哉
- 13:10 「枯草菌分泌酵素生産におけるシグナル伝達」
筑波大学・生物科学系 山根 國男
(座長 千葉 誠哉)
- 14:00 「トランスジェニックイネ：外来遺伝子の発現と制御」
植物工学研究所 島本 功
(座長 木下 俊郎)
- 14:50 休憩
- 15:10 「免疫強化剤による免疫応答の制御
—特に生体防御機構強化への応用—」
北海道大学免疫科学研究所 東 市郎
(座長 富田 房男)
- 16:00 「分化生物学における化学的手法の役割
—放線菌とフレンド白血病細胞を例として」
東京大学農学部 別府 輝彦
(座長 水谷 純也)
- 16:50 総合討論、閉会 シンポジウム世話人 大野 嗒司

枯草菌分泌酵素生産におけるシグナル伝達

(筑波大学・生物科学系) 山根 國 男

微生物は生育している環境に直接さらされているために、環境条件の変化に適切に対応することは、その生命を維持していくために必須である。枯草菌は α -アミラーゼやプロテアーゼ等の分解酵素を多量細胞外に分泌している。これら酵素の分泌生産は栄養状態が悪化した生育静止期に胞子形成と平行して活発に行われる。枯草菌がどのようにして栄養状態の悪化シグナルを受け止め、分泌酵素の生産に伝達しているかが最近明らかにされてきた。

B. subtilis 6160 を出発株とし、形質転換法と突然変異の誘発によって α -アミラーゼ生産量が1,000-2,000倍に増大したT2N26株をえた。この株における高生産性を支配する遺伝的因子について解析したところ α -アミラーゼの生産性のみを支配するものと、 α -アミラーゼ、プロテアーゼ、レバンシュウクララーゼなどの分泌型酵素群の生産性を同時に支配するものとに区別された。後者は細胞内のプロテアーゼの生産をも支配することから分解性酵素群 (*deg*遺伝子群) とされ、シグナル伝達系が含まれていることが明らかになってきた。また前者にはプロモーターの強さ、mRNAの安定性、構造遺伝子のコピー数の増大などに関係するものであった。

pap9 (*sacU^h*)変異は α -アミラーゼの生産性を2-3倍またプロテアーゼ、レバンシュウクララーゼの生産性を約100倍に増大させる。この遺伝子は田中ら⁽¹⁾、D. Hennerら⁽²⁾、またG. Rapoportら⁽³⁾によってクローン化され、解析された。その結果 *sacU* operon は *degS* *degU* の二つの遺伝子からなり、*degS*に由来するタンパク質 DegS (385アミノ酸) と *degU*に由来する DegU (229アミノ酸) とが Two-Component Sensor-Regulator system を構成するタンパク質のアミノ酸配列と類似していることが明らかにされた。DegS は protein kinase でありATPによりリン酸化され、DegUをリン酸化すること、またリン酸化された DegU が直接または間接的にアルカリ性プロテアーゼなどのプロモーターの上流域に作用し、転写能を増大させることが示された。また胞子形成欠損変異の一つである *spo0A* 変異はプロテアーゼなどの分泌酵素の生産性を抑えるがここにもタンパク質のリン酸化を介した情報伝達機構が存在することがJ.A.Hochら⁽⁴⁾によってあきらかにされている。また多コピーになった時に作用する *degQ*、*degR* は低分子量のペプチド (46および60アミノ酸) をコードしていることが明らかになっている。とくにアルカリ性プロテアーゼ遺伝子の発現に対して多数の因子がその転写に関係し、しかも細胞のおかれている環境を感知して、その発現を調節していることは興味深い。

1) T. Tanaka and M. Kawata. J. Bacteriol., 170, 3593 (1988). 2) D.J. Henner et al. J. Bacteriol., 170, 5102 (1988). 3) T. Msadek et al. J. Bacteriol., 170, 824 (1990). 4) J. A. Hoch et al. 国際微生物学会 (1990, 大阪)

— ヌ 毛 —

近年、植物が持つさまざまな生物機能の解析において遺伝子導入による形質転換体の作出が必須の手法となり、遺伝子発現における組織特異性や種々の外的、内的シグナルあるいはストレスによる発現制御の解析をはじめ、これらの制御に関わるシス因子およびトランス因子の同定などが形質転換体を用いることにより *in vivo* で、効率よく行なわれるようになった。また、これら基礎的研究に加え作物の改良においても遺伝子導入が有効な手段となることが期待されている。

ところが、最近まで形質転換植物を用いた研究の大部分はタバコ、ペチュニアなどの双子葉植物を材料として行なわれてきており、単子葉植物、特にイネ科植物では遺伝子を導入する方法が確立されていなかった。最近われわれはプロトプラストにエレクトロポレーションにより外来遺伝子を導入し、効率よく形質転換イネを作る方法を確立した。そして形質転換イネを用いて、遺伝子発現の質的および量的な制御に関する研究や有用遺伝子の導入によるイネの育種を試みている。

1) イネへの遺伝子導入

形質転換イネ作出の効率に関わる要因には、用いたイネ品種やプロトプラストの生理状態、エレクトロポレーションの電気条件などが多数あるが、なかでも形質転換体を選抜するための選抜マーカー遺伝子の種類および発現の強さが重要であった。われわれは選抜マーカーとしてハイグロマイシンを用い、非選抜遺伝子の導入には *co-transformation* 法を用いている。現在までに得られている結果では選抜マーカー遺伝子と非選抜遺伝子を1:1に混合し *Co-transformation* を行なった場合、 Hm^r カルスの30-50%には非選抜遺伝子も導入されている。

2) イネでの外来遺伝子の発現

大腸菌の β -グルキュロニダーゼ(*gusA*)は、遺伝子発現の質・量的および時間・空間的なコントロールを調べるための簡便でかつ感度の高いレポーター遺伝子である。そこでわれわれはまず植物で広く用いられているカラフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターのイネでの発現を調べ、また、トウモロコシ、コムギなどに由来する遺伝子のプロモーターの発現についても解析を行なった。

トウモロコシ *Adh-1* はイネ科植物の中では最も早く単離された遺伝子である。その発現については詳細な解析がなされており、トウモロコシ中での発現の組織特異性や嫌気条件下で急速に発現が誘導されることが知られている。この *Adh-1* プロモーターに *gusA* 遺伝子をつなぎイネに導入したところ、根（根冠）、花粉、はい、はい乳で発現がみられた。トランスジェニックイネの次代植物を用いた実験では、*Adh-1* プロモーターの発現は嫌気条件下で急速に誘導され mRNA、GUS活性ともに数十倍上昇した。これらの結果からトウモロコシ *Adh-1* プロモーターがトランスジェニックイネにおいてトウモロコシと同様の制御により発現していることが明かである。

ヒストン H3 遺伝子は発現が細胞周期に依存しており、細胞周期に関する遺伝子発現調節の研究には格好の材料である。このコムギヒストン H3 遺伝子プロモーターのトランスジェニックイネでの発現を調べたところ、根の分裂組織や若い葉で強い発現がみられた。さらに興味深いことにいくつかの組織の分裂の見られない細胞でも GUS 活性がみられた。こうした結果はイネヒストン H3 遺伝子の発現パターンと一致しており、コムギヒストン H3 遺伝子のプロモーターがイネの中でも正常にコントロールされて発現することを示唆している。

3) イントロンによる外来遺伝子発現の増大

イネ科植物ではイントロンによる外来遺伝子発現の増大がいくつか報告されている。われわれはトウモロコシ、イネ、ヒマの遺伝子のイントロンを用いて、イネにおける外来遺伝子発現への効果を調べた。その結果、イントロンはレポーター遺伝子の発現を5-数10倍上昇させた。このイントロンによる発現増大の程度は1)イントロンの種類、2)遺伝子の挿入部位によって大きく異なっており、発現の増大には効率のよいイントロンの切り出しが必要であることが明かとなった。

今後、植物でのトランスジェニックバイオロジーの発展にともない、トランスジェニックイネが植物科学においてますます有用な研究材料となるであろうと考えられる。さらに遺伝子導入による新しいイネの作出もそう遠いことではないだろう。

生体の免疫応答系は様々な仕組みで統御されており、その全体像を総合的に述べることは容易でない。ここでは私共によって過去20年にわたり行われた免疫強化剤(免疫アジュバント)の開発と、それを用いる生体防御機構強化に関する成績を中心に述べる。更に最近自己免疫疾患患者(SLE)のBリンパ球に見出されたアルギニン代謝異常と病態との関連についてもふれる。

結核菌やグラム陰性菌内毒素など細菌菌体及び菌体成分がきわめて強い免疫強化活性(アジュバント活性)を有することは周知のことである。私共は結核菌の菌体成分の免疫増強活性因子について詳細な検討を行い、特に結核菌の場合、細胞壁及び菌体糖脂質であるtrehalose-6,6'-dimycolate(TDM)にその活性が主として見出されることを明らかにした。更にBCG細胞壁の免疫アジュバント活性を応用し、癌の免疫学的治療について検討し、肺癌、胃癌について生存率に有効性を見出した。その後細胞壁の免疫増強活性最小構造単位がN-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine(MDP)であることがAdamらにより明らかにされたが、私共はMDPの関連化合物の化学合成を行い、その化学構造—免疫増強活性の相関について詳細な検討を行った。これら合成MDP誘導体を用いる生体防御機構強化への応用について検討し、特に(1)細菌、真菌、ウイルスなどの感染に対する宿主の非特異的防御能の強化、(2)抗癌免疫への応用、(3)ワクチンの抗原性の強化などに有効な合成免疫強化剤のスクリーニングを行い、2種のMDP誘導体、HDP-Lys(L18)及びB30-MDPを選抜した。

HDP-Lys(L18)は細菌、ウイルス感染に対する宿主の非特異的感染防御能の強化活性を有し、その機序としてInterleukin-I(IL-1)、Colony Stimulating Factor(CSF)などのサイトカイン誘導による免疫応答系の活性化によることが明らかにされた。HDP-Lys(L18)は肺癌患者などでの減少した白血球や血小板数の回復に有効であることが臨床治験により明らかにされている。B30-MDPはワクチンの免疫アジュバントとしての有用性についても検討されつつある。

合成TDM誘導体についても、TDMが本来有するマウスに対する毒性とアジュバント活性を解離する努力が続けられ、アジュバント活性を有する低毒性のTDM誘導体が開発された。

グラム陰性菌内毒素の活性因子であるlipid Aの関連化合物についても検討し、毒性が少なく、アジュバント活性を有する誘導体がスクリーニングされた。私共はグルコサミン誘導体(GLA-60)が強いマクロファージ活性化能を示すと共に、インターフェロンと共に投与し、内因性の腫瘍壊死因子(TNF)を誘導することにより、癌の転移を阻止することが可能であることを示した。

以上の例にみられるように免疫アジュバントは、免疫応答を調節しその機序を明らかにするために有用であると共に、生体防御機構の強化にも応用可能であることが示唆された。

分化生物学における化学的手法の役割 — 放線菌とフレンド白血病細胞を例として

(東大農化)・別府輝彦

変異株の分離と遺伝子クローニングは、御地圃にもれず細胞分化の生物学において主流となつて久しい。一方でその分だけ、長く生化学者の主要な武器であった特異的酵素阻害剤をはじめとする有機低分子化学の役割がたいがしりにされているのかも知れない。ここでは、たまたま我々がとり上げている、放線菌とフレンド白血病細胞という全く異なる細胞分化の系において、分化誘導物質の発見がもたらした可能性について述べる。

I. 放線菌の分化誘導ホルモン・A-ファクター

放線菌は、原核生物でありながらカビに似た高度に分化した形態を有し、また各種の抗生物質を含む多様な二次代謝産物の生産能で特徴づけられる。A-ファクターは、*Streptomyces griseus* が自ら生産し、 10^{-9} Mで自らの孢子着生とストレプトマイシン生産を誘導する自己制御因子である。形態分化の指標としての孢子形成と、細胞分化の化学的表現ともい得る二次代謝を、同時にかつ正に制御するA-ファクターの機能は、真核生物におけるホルモンと類似しているといえる。最近になって、化学合成した放射性A-ファクターを用いることにより、*S. griseus* 細胞内に特異的な結合蛋白が同定された。さらに、この結合蛋白欠損変異株においてストレプトマイシン生産、孢子着生が共に著明に上昇することから、結合蛋白が負のレギュレーターとして働く分化制御機構の存在が明らかになった。これらの知見は、原核生物における細胞分化の制御に新しい照明を当てるとともに、抗生物質生産菌の育種にも改めて実用的示唆を与えるものである。

II. トリコスタチンによるフレンド白血病細胞の分化

我々は、フレンド白血病細胞の赤血球への分化をDM50に代って誘導する物質のスクリーニングによって、放線菌の二次代謝産物の中からトリコスタチン(TS)を発見した。 10^{-8} Mで強力な分化誘導能を発揮するTSの作用機構を、主としてrat fibroblast 3Y1について検討した結果、本物質がやはり 10^{-8} M程度の低濃度で細胞周期のG₁及びG₂期の進行を特異的に阻止する一方、S期、M期の進行には全く影響を与えないことが明らかになった。さらに、TSによってG₂期停止を受けた細胞は、その間にG₂期から直接G₀期に導入され、その結果TS添加・除去処理によって高い効率で増殖性の四倍体細胞が作り出されることが示された。最近になって、上記のようなTSの細胞増殖に対する作用が、ヒストン脱アセチル化酵素の特異的阻害によるものであることが完全に証明された。このことは、ヒストンのアセチル化の度合いが、細胞の増殖・分化を制御する上で決定的な役割を果たす場合があることを、はじめて明瞭に示したものである。また、TSがSV40トランスフォーム細胞に選択的致死作用を及ぼすことは、G₁、G₂特異的阻害剤を手がかりとする新しい型の抗がん剤開発の可能性を示唆している。

TSの他にも、おそらくcdc2制御系の新しい構成要素を作用点とするレプトマイシン、各種のプロテインキナーゼの阻害剤として知られるスタウロスピリン及びその誘導体等によって、真核細胞の細胞周期はこれまでに全く想像されなかった可塑性を示すことが明らかになりつつある。細胞分化と細胞周期の間の深い相関を考へれば、今後分化の生物学においてこれらの特異的阻害剤が強力な武器となることが充分予想されよう。

北海道農芸化学協会特別会員御芳名

(ABC順)

旭油脂株式会社
ベル食品株式会社
福山醸造株式会社
富良野市ぶどう果樹研究所
合同酒精株式会社
北海道朝日麦酒株式会社
北海道日産化学株式会社
北海道糖業株式会社
北海道和光純薬株式会社
北海三共株式会社
北海製罐株式会社 罐詰研究所
北開水工コンサルタント株式会社
池田町ブドウ・ブドウ酒研究所
岩田醸造株式会社
株式会社ズコーシャ
関東化学販売株式会社
キッコーマン株式会社 千歳工場

麒麟麦酒株式会社 千歳工場
日本化学飼料株式会社
日本清酒株式会社
日本新薬株式会社 札幌工場
日本甜菜製糖株式会社 技術部
ニッカウキスキー株式会社
サッポロビール株式会社 北海道工場
サッポロビール株式会社 札幌工場
札幌酒精工業株式会社
サントリー株式会社 千歳工場
宝酒造株式会社 札幌工場
高砂香料工業株式会社 札幌出張所
十勝農業協同組合連合会 農産化学研究所
よつ葉乳業(株)リサーチセンター
雪印乳業株式会社
雪印食品株式会社
有限会社和科盛商会