

生物工学技術応用への展望

研究協力者 萩 田 善 一

(富山医科薬科大学和漢薬研究所)
病態生化学部門

先天性代謝異常症をもたらす異常酵素に関する研究は、遺伝子工学的研究技術の導入により遺伝子 DNA の塩基配列の異常としてとらえられ、さらに DNA 診断法の開発へと展開されつつある。これら最近における代謝異常症の遺伝工学的研究によってえられた知識の集積として適正な治療法の確立が望まれている。

劣性遺伝形質としての代謝異常症の多くのものは酵素活性値の低下もしくは欠陥によってもたらされる。したがって、一般に治療法としてヒトの受精卵への正常遺伝子の移入による遺伝子治療が考えられている。しかし、本研究においては次世代への影響のない治療法の確立を目指している。

本研究の目的は、すでに確立された細胞融合、再構成細胞形成法や染色体分離法などの遺伝工学的研究技術は勿論のこと、さらに生殖生物学および発生工学的研究技術を集約することによって、先天性代謝異常症診断法を確立することにある。また、患者白血球より得られた異常遺伝子 (DNA) を動物受精卵に移入するという発生工学的手法による病態モデル動物を育成し、遺伝子発現過程の解析に基づく発症防止法をも検討することによって、遺伝性疾患の新しい診断と治療法を開発することにある。

研 究 成 果

I. 遺伝工学的研究

1. 遺伝子工学的研究手法による新しい診断法の確立

(1) 新しい方式によるベクターとしてのプラスミド精製法の確立

DNA 診断法におけるプローブとしての遺伝子のクローニングには、多くの種類の遺伝子が準備されなければならないことから、経済的で簡単でしかも迅速な方法であることが必要である。

従来から種々のプラスミド精製法が報告されてきたが、Mandel らの方法と Cauther らの方法を組み合わせ、これに高速液体クロマトグラフィーを応用することにより、超遠心することなしに短時間に効率よく精製する方法を確立し、報告した (The Physico-Chemical Biology 29 : 261~265, 1985)。

すなわち、リゾチームにエチジウムブロマイド (EtBr) を加えて宿主菌を溶菌することにより、閉環状プラスミド DNA を高率に回収することが可能となった。さらにポリエチレングリ

コール6000溶液中で遠心分離することにより低分子の RNA を除去し、プラスミド DNA 分画を BioGel A-100 を担体とする高速液体クロマトグラフィーを用いて精製した。

本方法により精製されたプラスミドの収量は、大腸菌の 1 l 培養液当たり 1.8~2.0 mg と以前の方法に比べて5~10倍に増収していた。また菌体回収から精製プラスミドを得るまでに要する時間も 8 時間程度であり、超遠心による方法 (24~48時間) と比較してはるかに時間を短縮することに成功した。

この方法を用いて、5 Kb 程度の長さの比較的短い遺伝子ばかりではなく、コスミドをベクターとする 40 Kb を越えるような長い遺伝子のクローニングにも成功した。

(2) 二次元電気泳動法による微量遺伝子産物のフィンガープリント法の確立

クローン化された遺伝子の機能を確認するため、遺伝子産物である微量の蛋白、酵素などを検出するに適した、ポリアクリルアミドゲルを支持媒質とする二次元電気泳動法について検討した。その結果、蛋白の検出については、銀染色法ならびにオートラジオグラフィー法を応用することによって微量蛋白の検出条件を確立することができた。

一方、クローン化された遺伝子を検出するに適した電気泳動の支持媒質としてゼラチン含有アガロースゲルを開発し、報告した (Electrophoresis 6:138~140, 1985)。液体窒素による細胞の破壊と超音波処理による融解により細胞膜を破壊させ、蛋白分解酵素ならびに RNase などで処理し、開発したゼラチン含有アガロースゲルを支持体とする電気泳動法で DNA 分画を精製する方法を現在検討中である。

(3) 基質特異的酵素のザイモグラム法による核酸分解酵素検出法の確立

酵素活性検出法と電気泳動法とを組み合わせることによりザイモグラム法が確立され、アイソザイムの研究に大きな役割を果たしてきた。ザイモグラム法の多くのものは、反応生成物が不溶性でしかも着色している物質の形成をもって活性泳動体を検出することを原理としている。すなわち、ザイモグラム法は、組織化学領域で用いられた染色法と電気泳動法とを組み合わせたものが多い。

したがって、このようなザイモグラム法をアクリルアミドゲルを支持媒質とする電気泳動法では基質が高分子である場合や着色水溶性の物質である場合には鮮明な分離像を得ることが困難であった。

そこで、ポリアクリルアミドゲルを支持媒質とする薄層電気泳動法で泳動分離したゲル薄層を、基質溶液を含んだセルロースアセテート膜を密着させ、セルロースアセテート膜に転写された活性泳動帯を検出する方法を確立した。

この方法を、核酸分解酵素の検出法に応用し、基質として DNA あるいは RNA を用いることによって、DNA 分解酵素ならびに RNA 分解酵素アイソザイムを分離検出することに成功した。

2. 染色体工学的的手法による新しい診断法の開発

(1) ヒト染色体の分画と特定染色体のクローニング法の確立

ヒト末梢血リンパ球を同調培養し、分裂中期の細胞より染色体をセルソーター (Epics V型) を用いて分画し、flow karyotype 得ることに成功した。

すなわち、1. ヒト由来培養細胞をコルセミドを用いて同調培養し、分裂中期細胞を採集する ($10^6 \sim 10^8$ 個)。2. 0.075 M KCl で低張処理したあと、界面活性剤である digitonin をふくむ Tris-polyamine buffer に細胞を浮遊させる。3. 細胞浮遊液をゆるやかに26G注射針中を通過させ、細胞膜を破壊し染色体を遊離させる。4. ゆるやかに遠心すると上清に約90%の純度で染色体が得られる。5. DNA に親和性のある蛍光色素エチジウムブロマイドで染色体を染色し、セルソーター用試料溶液とする。6. 蛍光染色された染色体は緩衝液に浮遊した状態で圧縮窒素ガスによりおしだされ、フローチェンバーのノズルの中心部より流出する。このノズルは特殊構造をとり、シース液が常に染色体浮遊液のとおり中心の水流を包むように流出するため、染色体はこのシース液に保護されて、液体ジェットとして流出する。7. 一方、集束されたレーザー光線はこの液体ジェットをヒットし、染色体の大小により生じた陰影の差はレンズをとうして散乱光ディテクターに感受される。8. これと同時にレーザー光線は蛍光色素を励起し、蛍光強度は蛍光集束レンズをとうしてディテクターに感受される。各ディテクターからの電気信号はコンピューターに送られる。9. 液体ジェットに圧電クリスタルで振動を与え、検出ゾーン直下で液体ジェットを分断し液滴を形成させる (液滴形成速度10,000~90,000個/秒)。10. 各液滴について散乱光と蛍光が検出され、その強度に比例した電圧に変換されるので、デジタル変換により数値あるいはヒストグラム表示が可能であり、染色体の分画プロフィール、すなわち flow karyotype を知ることが可能である。11. 得られた flow karyotype から分取しようとする分画をコンピューターに指令すると、液滴形成直前に目的とする染色体を含む液滴に+あるいは-の電荷がかけられる。12. 荷電した液滴は2,000ボルトの偏向プレートにより分離捕集容器に捕集され、染色体を分取できる。このようにしてえられた flow karyotype の分析から、個人により DNA 含量ならびに分離像に差異のあることが明らかになった。また、染色体異常を有する細胞の flow karyotype 分析から、異常染色体を容易に検出することが示唆された。さらに特定染色のみを分取することにも成功した。

3. 細胞工学的手法による新しい診断法の開発

(1) 再構成細胞ならびに細胞質雑種細胞による核と細胞質の相互関係

A. ラットとマウスから得た再構成細胞における遺伝子発現機構を HPRT ならびに APRT のアイソザイムを指標として電気泳動法的に解析した。

マウスメラノーマ由来の B₁₆ 細胞から、ヒポキサンチンのアナログである8-アザグアニンおよび6-チオグアニンを用いて、HPRT 欠損突然変異株を数種分離した。培養細胞を採取、洗浄した後、超音波破碎を行い、20,000 g, 30分間遠心した上清を試料とした。荻田により開発された微量電気泳動法により泳動分離後、Bakey らの方法で HPRT ならびに APRT 活性を検出した。

その結果、マウスのメラノーマ細胞 B₁₆ とラットの HPRT 欠損細胞 L6TG 由来の細胞質

を融合させて得られた細胞質雑種細胞（サイブリッド）のあるクローンでは、マウス HPRT の主成分よりも陽極側に速い易動度をもつ活性泳動帯として検出された。これは、マウスゲノムの HPRT 遺伝子の発現が、ラットの細胞質の影響を受ける可能性のあることを暗示している。この現象を確かめるために、マウス B₁₆ 細胞由来の核と、ラット L6TG 細胞由来の細胞質を融合して得られた再構成細胞を解析した。あるクローンにおいては、サイブリッドにおいて得られたと同様に、マウス HPRT 遺伝子の発現はラット細胞質の影響を受け、マウス HPRT の主成分の易動度が速くなると同様に、活性値も減少する傾向のあることが認められた。

以上の結果は、核のゲノムに含まれている遺伝子の発現が細胞質による影響を受けていることを暗示している。

(2) 新しい再構成細胞形成法の確立

従来、再構成細胞の採取は、クロラムフェニコールをふくむ HAT 選択培地を使った二重選別法が広く用いられてきた。しかし、この方法は再構成細胞のコロニーが出現するまでに長時間を要し、また頻度も低く、さらにそれを適用できる親細胞の種類が限られていることなど、いくつかの欠点を持っている。

われわれは、セルソーターを利用して、再構成細胞を短時間に大量作製し選別分取できる新しい方法を考案し、その適用について検討することによって、有用性を明らかにすることができた。

すなわち、ラット筋肉芽細胞 (L6TG) を、サイトカラシン B を含む Ficoll 溶液の不連続密度勾配遠心により脱核し、細胞質体 (Cytoplasm) を得た。この中には核をもつ細胞も混入するため、DNA に親和性のある蛍光色素 Hoechst 33342 で核を染色し、蛍光を発しない Cytoplasm のみをセルソーターで分画することによって回収した。次いでセンダイウイルスを用いてマウステラトカルシノーマ細胞と L6TG Cytoplasm を融合させ再構成細胞を得た。この再構成細胞をマウスを用いて作製したラット細胞表面抗原特異的抗血清、ならびにヤギ FITC 標識抗マウス免疫グロブリン抗体を用いて、間接蛍光抗体法で染色を行った。次にセルソーターを用いて蛍光を発する細胞集団を分画分取し、培養を継続すると、核を持たない Cytoplasm は死滅消失し、増殖能力をもった再構成細胞のみを分取することができた。

セルソーターを利用した再構成細胞の作製ならびに選抜法に関する、この新しい方法は、以下の点で従来の方法に比較して有用である。

① 核および細胞質にマーカーを持たない細胞にも応用できる。② 再構成細胞の選別が短時間で行えるため、融合初期の現象を観察することができる。また、Cytoplasm を繰り返し融合させることができるので、一個の Cytoplasm の融合によっては発現形質に変化を生じなかった核に対しても、細胞質の量的効果が期待できる。③ 従来の方法ではコロニー分離が必須であり、一個の再構成細胞から増殖したコロニーについて、その形質の変化を観察していた。本方法では、個々の細胞について解析を行うのではなく、細胞集団を集団遺伝学的手法により取り扱うことができる点によって特徴づけられる再構成細胞作製法である。

II. 発生工学的研究

1. 一卵性双生仔マウス育成法の確立

遺伝子発現過程を同一遺伝的背景をもつマウスで比較するために用いる一卵性双生仔の育成法を検討し、得られた成果を報告した（医学のあゆみ128：T83-T87, 1984, J. Exp. Zool., 229：475~480, 1984）。

2. マウス受精卵へのヒトグロビン β 鎖遺伝子の移入

プラスミド pBR322 あるいはコスミド pJB8 をベクターとしてクローニングされたヒトの正常あるいは病的グロビン β 鎖遺伝子領域をマウス受精卵や初期胚に移入し、その発生過程に伴うグロビン遺伝子の発現調節機構を解析するため、以下のような研究を行った。

1) ヒトグロビン β 鎖遺伝子のマウス受精卵への移入

マウス受精卵 ($BDF_1 \times BDF_3$) の雄性前核にヒトグロビン β 鎖遺伝子 (4.4 Kb, Pst I /Pst I) および pBR322 DNA を200コピー移入した。出生した25匹のマウスの脾臓よりゲノム DNA を抽出し、ドット法およびサザン法により解析したところ、4匹のマウスゲノム中にヒトグロビン β 鎖遺伝子が挿入されていた。そのうち1匹には完全なヒトグロビン β 鎖遺伝子が挿入されていることが確認された。さらにこれらの形質転換マウスにおけるヒトグロビン β 鎖遺伝子の発現を調べるために、これらのマウスの赤血球より酸-アセトン法によりグロビン蛋白を抽出し、等電点電気泳動法により解析した。その結果、完全なヒトグロビン β 鎖遺伝子を有するマウス個体においてのみ、ヒト β -グロビンと同じ等電点を有する蛋白分画が検出された。この結果を裏付けるために、これらのマウスの骨髄細胞および肝細胞より RNA を抽出し、ドット法により解析したが、ヒトグロビン β 鎖遺伝子に由来する mRNA は検出されなかった。

次いで、得られた形質転換マウスをそれぞれ正常マウス (C57BL/6) と交配し、得られた雑種第1代のマウスにおいて、生後10日目および15日目で突然死亡する個体が出現した。この突然死の原因が、移入されたヒトグロビン β 鎖遺伝子の機能あるいは挿入された染色体上の位置に基づくものであるかについては確証は得られなかった。

2) ヒトグロビン β 鎖遺伝子群のマウス受精卵への移入

マウス受精卵 ($BDF_1 \times BDF_1$) の雄性前核に $A\gamma$, $G\gamma$, $\phi\beta$, δ , β 領域およびコスミド DNA (pJB8) を含むヒトグロビン β 鎖遺伝子群 (41.4 Kb, Kpn I 断片) を200コピー移入した。出生した61匹のマウスの脾臓よりゲノム DNA を抽出し、ドット法ならびにサザン法で解析したところ、16匹のマウスにヒトグロビン β 鎖遺伝子が挿入されていた。これらの形質転換マウスでは全領域にわたるヒトグロビン β 鎖遺伝子群は挿入されてはならず、領域の一部が単独であるいは組み換えられた状態で挿入されたと思われる。

以上の結果は、The ninth International Symposium-Molecular genetics in developmental neurobiology, 第5回富山カンファレンス, 日本人類遺伝学会第30回大会, 第8回日本分子生物学会年会, および日伊生物科学セミナーにおいて発表した。

厚生省科学研究費は、ここに述べた研究の一部を行うために使用された。

研究発表

ア 学会誌等

- 1) Isobe, M. and Ogita, Z. : Electrophoretic analysis of pancreatic proteases and zymogen-acting factors in the mouse. *J. Exp. Zool.*, **230** : 347~354, 1984.
- 2) Isobe, M. and Ogita, Z. : Two dimensional gel analysis of zymogen-activating factors in small intestine of the mouse. *J. Exp. Zool.*, **231** : 19~26, 1984.
- 3) Isobe, M. and Ogita, Z. : Electrophoretic analysis of pancreatic proteases and zymogen-activating factors in mice. *Electrophoresis '83* (Ed. by H. Hirai), 221~228, Walter de Gruyter, Germany. 1984.
- 4) Tojo, H. and Ogita, Z. : An improved method for destroying mouse blastomeres electrically inside the zona pellucida and the *in vitro* development of the surviving blastomeres. *J. Exp. Zool.*, **229** : 475~480, 1984.
- 5) Maruyama, Y., Yasutomi, K. and Ogita, Z. : Electrophoretic analysis of esterase isozymes in organophosphate resistant mosquitoes, (*Culex pipiens*). *Insect Biochem.*, **14** : 181~188, 1984.
- 6) 桃井啓子, 岩橋寛治, 柴田 太, 荻田善一 : ベルベリン感受性マウスの選択的育成. *和漢医薬学会誌*, **1** : 254~259, 1984.
- 7) Momoi, K. and Ogita, Z. : A new colorimetric determination of atropin esterase activity using the 2-nitrophenylhydrazine coupling reaction. *Jpn. J. Clin. Chem.*, **13** : 245~249, 1984.
- 8) 荻田善一, 東條英昭 : 体細胞遺伝学から発生工学へ. *生体の科学*, **35**(2) : 83~89, 1984.
- 9) 桃井啓子, 磯部正治, 久村富徳, 丸山由紀子, 荻田善一 : セルソーターによるヒト染色体の分取とその利用. *医学のあゆみ*, **128** : T55~T58, 1984.
- 10) 東條英昭, 林 和子, 荻田善一 : 哺乳類初期胚における割球の totipotency と分化. *医学のあゆみ*, **128** : T83~T87, 1984.
- 11) 荻田善一, 桃井啓子, 久村富徳, 丸山由紀子 : ヒト染色体地図をめぐる新技術の展開 <1>. *薬の知識*, **35**(6) : 20~21, 1984.
- 12) 荻田善一, 丸山由紀子, 久村富徳 : ヒト染色体地図'84. *薬の知識*, **35**(10) : 22~24, 1984.
- 13) 荻田善一, 丸山由紀子, 久村富徳 : ヒト染色体地図 '84. *薬の知識*, **35**(11) : 10~16, 1984.
- 14) Momoi, K., Isobe, M., Kumura, Y. and Ogita, Z. : An isolation of human chromosomes by cell sorter. *Jpn. J. Human genet.*, **29** : 199, 1984.
- 15) Ogita, Z. : A developmental engineering approach to human genetics. *Jpn. J. Human Genet.*, **29** : 171~172, 1984.
- 16) 荻田善一 : アイソザイムの生物学. *生物物理化学*, **28** : 201~206, 1984.
- 17) 堀越葉子, 荻田善一, 井上恭一, 佐々木 博 : 組織内 SOD の電気泳動的解析法. *日本臨床代謝学会記録集*, **XX** : 202~203, 1984.
- 18) 井上恭一, 康山俊学, 古谷田裕久, 佐々木博, 堀田善一 : 肝疾患における肝組織内 SOD の電気泳動的解析. *日本臨床代謝学会記録集*, **XX** : 200~201, 1984.
- 19) 森田瑞枝, 稲垣克彦, 金谷高志, 安倍政利, 荻田善一 : 関節リウマチ患者における証の

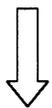
- 分布. 和漢医薬学会誌, 1 : 156~157, 1984.
- 20) Kunisada, T., Yamagishi, H., Ogita, Z., Kirakawa, T. and Mitsui, Y. : Appearance of extrachromosomal circular DNAs during *in vivo* and *in vitro* aging of mammalian cells. Mechanisms of Aging and Development, 29 : 89~99, 1985.
 - 21) Tojo, H., Ogita, H. and Momose, Y. : Comparison of the *in vitro* development of mouse single blastomeres with and without the zona pellucida. Experimentia, 41 : 108~109, 1985.
 - 22) Shibata, F. and Ogita, Z. : Control of electroendosmosis on agarose gellayers by use of modified gellatins. Electrophoresis., 6 : 138~140, 1985.
 - 23) Mori, A. and Ogita, Z. : Rapid and economical method for purification of plasmid DNA. The Physico-Chemical Biology., 29 : 261~265, 1985.
 - 24) 桃井啓子, 荻田善一 : ウサギにおけるアトロピン応答性の薬理遺伝学的研究. 和漢医薬学会誌, 2 : 20~26, 1985.
 - 25) Taie, H. and Ogita, Z. : A significant effect of Hachimi-zio-gan on arginine aminopeptidase in mice submaxillary gland. J. Med. Pharm. WAKAN-YAKU., 2 : 411~417, 1985.
 - 26) Kikuchi, T., Matsuda, S., Kadota, S., Murai, Y. and Ogita, Z. : Gonoderic acid D.E.F. and H. and Lucidenic acid D.E. and F., new triterpenoids from Ganoderma Lucidum. Chem. Pharm. Bull., 33 : 2624~2627, 1985.
 - 27) Kikuchi, T., Matsuda, S., Murai, Y. and Ogita, Z. : Gonoderic acid G. and I. and Ganolucidic acid A. and B., new triterpenoids from Ganoderma Lucidum. Chem. Pharm. Bull., 33 : 2628~2631, 1985.
 - 28) 荻田善一 : 老化予防と和漢薬. Pharma Medica, 新春増刊号 : 79~82, 1985.
 - 29) 荻田善一 : 個人差の遺伝学. Therapeutic Research., 2 : 269~278, 1985.
 - 30) 村松正実, 荻田善一, 尾形悦郎 : 遺伝子工学, 細胞工学と臨床. 臨床医, 11 : 763~777, 1985.
 - 31) 荻田善一, 丸山由紀子 : 臨床遺伝学における組換え DNA-DNA 診断. 神経研究の進歩, 29 : 379~389, 1985.
 - 32) 岩橋寛治, 柴田 太, 桃井啓子, 荻田善一 : ベルベリン応答性マウスの育成. 和漢医薬学会誌, 2 : 252~253, 1985.
 - 33) タイエハムディ, 柴田 太, 桃井啓子, 荻田善一 : 八味丸応答性マウスの育成. 和漢医薬学会誌, 2 : 254~255, 1985.
 - 34) 久保喜一, 荻田善一 : ジャコウ代替品の開発. 和漢医薬学会誌, 2 : 128~129, 1985.
 - 35) 森田瑞枝, 稲垣克彦, 金谷高志, 安倍政利, 荻田善一 : リウマチ患者集団と健常者集団における証の分布の比較. 和漢医薬学会誌, 2 : 116~117, 1985.
 - 36) Ogita, Z., Momoi, K. and Kumura, Y. : Flow karyotype analysis by cell sorter and developments for chromosome engineering. Jpn. J. Human Genet., 30 : 87~88, 1985.
 - 37) Mori, A. and Ogita, Z. : Cloning of human β -globin gene cluster. Jpn. J. Human Genet., 30 : 144, 1985.
 - 38) Hombo, Y., Takamura, S. and Ogita, Z. : Evaluation of the embryotransfer through cervical canal using mice. Jpn. J. Human Genet., 30 : 145, 1985.
 - 39) 吉森寿美代, 古田 勲, 荻田善一 : 全身的な hypertrichosis を伴った idiopathic fibro-

- matosis の一例. 人類遺伝学雑誌, **30** : 168, 1985.
- 40) Kanaya, T., Abe, M., Maruyama, Y., Morita, M., Inagaki, K. and Ogita, Z. : Genetic background of "Syo" in the treatment in oriental medicine. Jpn. J. Human Genet., **30** : 184, 1985.
- 41) 林 和子, 坂本栄子, 荻田善一 : マウス初期胚の発生過程における蛋白成分の変動. 生物物理化学, **29** : 308, 1985.
- 42) 荻田善一, 丸山由紀子, 黒沢信幸 : 基質特異的酵素のザイモグラム法. 生物物理化学, **29** : 324, 1985.
- 43) 森 篤雄, 荻田善一 : 迅速で経済的なプラスミドの精製法. 生物物理化学, **29** : 325, 1985.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



先天性代謝異常症をもたらす異常酵素に関する研究は、遺伝子工学的研究技術の導入により遺伝子DNAの塩基配列の異常としてとらえられ、さらにDNA診断法の開発へと展開されつつある。これら最近における代謝異常症の遺伝工学的研究によってえられた知識の集積として適正な治療法の確立が望まれている。

劣性遺伝形質としての代謝異常症の多くのものは酵素活性値の低下もしくは欠陥によってもたらされる。したがって、一般に治療法としてヒトの受精卵への正常遺伝子の移入による遺伝子治療が考えられている。しかし、本研究においては次世代への影響のない治療法の確立を目指している。

本研究の目的は、すでに確立された細胞融合、再構成細胞形成法や染色体分離法などの遺伝工学的研究技術は勿論のこと、さらに生殖生物学および発生工学的研究技術を集約することによって、先天性代謝異常症診断法を確立することにある。また、患者白血球より得られた異常遺伝子(DNA)を動物受精卵に移入するという発生工学的手法による病態モデル動物を育成し、遺伝子発現過程の解析に基づく発症防止法をも検討することによって、遺伝性疾患の新しい診断と治療法を開発することにある。