ホタルルシフェラーゼ——生産・利用・人工変異 中野衛一*

ホタルは遠い夏の思い出となってしまった観があるが、今、その姿を変え、研究や産業の場に蘇ろうとしている。ホタルの発光酵素ルシフェラーゼの遺伝子がクローン化され、大腸菌でルシフェラーゼの大量生産が可能となった。そして、ルシフェラーゼの人工変異では、天然に存在しない色の光を発する酵素が開発された。量産ルシフェラーゼを用い、様々な分野で、その利用が始まろうとしている。

夏の風物詩、ホタル。ホタルは世界に2千種前後生息すると言われているが、そのほとんどは水中生活を必要としない陸生ホタルである。これに対し、日本の代表的なホタルであるゲンジボタルやヘイケボタルは数少ない水生ホタルに属し、河川的环境汚染と関連して語られることが多い。

ホタルの発光に関しては、古くから研究がなされ、図1に示す反応が関与することが知られている。つまり、ルシフェリンという化合物が、ルシフェラーゼという酵素の働きによって酸化され、その際に光が発せられるのである。ホタルに限らず、オワンクラゲや夜光虫など発光生物による発光は、一般に、ルシフェラーゼとルシフェリンの関与で説明されるが、それらは生物種間で必ずしも同じではなく、むしろまったく異なる分子構造であることが多い⁽¹⁾。一方、ホタルのルシフェリンは、種々のホタルやヒカリコメツキといった発光性昆虫の間で共通の構造をもち、ルシフェラーゼもこれら昆虫では構造が類似している⁽¹⁾。

ホタルの発光には ATP が要求され、これが他の発光生物には見られない大きな特徴となっている。発光の検出には極く微量の ATP で十分なので、ホタルルシフェラーゼを用い、ATP の高感度測定が可能である。生体内の多くの反応がその生成や消費に結びついているので、ATP 測定の潜在需要はかなり大きいと予想され、北米産ホタル (*Photinus pyralis*) を出発材料とする従来のル

図1 ■ ホタルの発光反応

シフェラーゼ製造法では、その安定供給に限界があると考えられた。

そこで筆者らは、ホタルルシフェラーゼを遺伝子組換え体で大量生産することを計画し、1985年秋、その研究を開始した。我が国で最も一般的なホタルであるゲンジボタル (*Luciola cruciata*) に狙いを定め、ルシフェラーゼ遺伝子のクローニングを行なったわけであるが、その経緯⁽²⁾および詳細⁽³⁾については既報を参照されたい。

工業的に酵素の大量生産を行なうための宿主-ベクター系については、大腸菌とそのファージを利用してすでに開発済であったので^(4,5)、このシステムを用い、ゲンジボタルおよびヘイケボタル由来ルシフェラーゼの大量生産に成功した。一方その間、利用に関しても単なる ATP の測定にとどまっておらず、汚染微生物の検出など幅広い用途へと展開されていた。そして、組換え体による大量供給と呼応し、新しい利用分野が形成されようとしている。

遺伝子組換え法のもう一つのメリットは、遺伝子の改変により、その酵素を容易に改良できるこ

Luciferase of Firefly—Its Production, Utilization and Artificial Mutation

* Eiichi NAKANO, キッコーマン(株)研究本部

とである。この手法により、筆者らは光の色がオレンジや赤の変異体ルシフェラーゼを得た⁽⁶⁾。以下、ホタルルシフェラーゼの生産、利用、および人工変異につき、順次話を進めていきたい。

組換え体によるホタルルシフェラーゼの生産

1. クローニング

真核生物由来の酵素などを大腸菌のような原核生物を用いて生産する場合、真核生物染色体上の遺伝情報をそのまま利用することはできない。真核生物の遺伝子には介在配列（イントロン）があり、イントロンを処理する機能をもたない原核生物では、その情報を発現できないからである。そこで、染色体遺伝子の代わりに mRNA の配列をそっくりコピーした DNA、つまり cDNA (complementary DNA) を遺伝子として利用するのである。

陸生ホタルの一つ、北米産ホタルについては、大分前よりカリフォルニア大学 DeLuca らのグループで精力的に研究が進められていたが、筆者らはまず、ゲンジボタルよりルシフェラーゼ cDNA をクローニングすることから研究に着手した。

ゲンジボタルの発光器より mRNA を調製し、それらを鋳型として cDNA を合成し、大腸菌を宿主とする cDNA ライブラリーを作製した。そして、そのライブラリーの中から、悪戦苦闘の末、ゲンジボタルルシフェラーゼ cDNA をもつクローンを見つけた⁽³⁾。

得られた cDNA は全長 1,993 塩基対で、その中に 548 アミノ酸残基の蛋白質をコードする 1,644 塩基対の配列（オープンリーディングフレーム）が含まれていることがわかった。この結果より、ゲンジボタルのルシフェラーゼは分子量 6 万の蛋白質と推定された。

予想してはいたが、北米産ホタルの研究のほうがやや先行し、そのルシフェラーゼの配列は、少し前、DeLuca らにより発表されていた⁽⁷⁾。北米産ホタルの場合、550 アミノ酸残基から成る分子量 6.1 万の酵素で、ゲンジボタルとは 2 残基分の違いがあるだけであった。また、陸生と水生の違

いにもかかわらず、両者のアミノ酸配列は驚くほど一致する部分が多く、全体の相同性は 67% と計算された。

そこでさらに、同じ水生であるヘイケボタル (*L. lateralis*) より cDNA をクローニングして調べてみた。その結果、ヘイケボタルルシフェラーゼもまた、548 アミノ酸残基から成り、ゲンジボタルのそれとは実に 94% の相同性があることがわかった。

日本産水生ホタルのルシフェラーゼは、その 1 次構造において、このようにきわめて類似しているにもかかわらず、ホタルより精製した酵素の諸性質を調べてみると、面白いことに、ゲンジボタルの酵素はむしろ北米産ホタルのものと似ていることがわかった⁽⁹⁾。ヘイケボタルのルシフェラーゼは、ゲンジボタルや北米産のものと比べ、やや青味がかかった光を発し、熱安定性において最も優れた性質を示したのである⁽⁸⁾。

2. 生産システム——スリーパー

さて、このようにして得られたルシフェラーゼ cDNA を利用し、ルシフェラーゼの大量生産を試みるわけであるが、大腸菌を用いた場合、特に動物由来の蛋白質の生産にはかなりの困難を伴う場合が多い。動物蛋白質の場合、菌体内で凝集体（インクルージョンボディ）を形成し、その本来の高次構造を失ってしまうことがしばしばある。そのような場合、通常、目的の蛋白質は大量に生産されるが、その精製に際し、高次構造を再構成するための複雑な工程が必要となり、大規模工業化は困難となる。目的とする産物が幸いにして凝集体とならなかった場合でも、もう一つやっかいな問題がある。一般に高生産株ほど安定性が低下しやすく、容易に生産量の低い株へと変化してしまうのである。

ほとんどの場合、組換え体で生産しようとする蛋白質は宿主にとってまったく役に立たないものなので、程度の差はあるが、宿主の生育に悪影響を及ぼすこととなる。したがって、生産量を高めようとするれば、菌の生育にとってそれだけ負担が増すことになり、菌株が不安定となってしまうの

であろう。目的の産物による生育阻害を最小限に抑えながら、しかもその産物を最大限生産させるために、何らかの工夫が必要となる。

このように微妙で複雑な問題に対処すべく、筆者らはすでにスリーパーという工業生産用ベクターを開発している^(4,5)。スリーパーベクターを用いると、ターゲット遺伝子を宿主染色体へ組み込むことが可能である。組み込まれた遺伝子は普段ほとんど発現せず、宿主にとって役に立たない産物が作られないので、組換え体細胞は非組換え体と同じように生育し、安定である。目的とする産物の生産は、組換え体の培養温度を一時的にシフトすることにより始まり、その後の培養により目的の産物を大量に生産できるのである。

スリーパーベクターは大腸菌λファージを母体に作られ、通常のクローニング用ベクターと大きく異なる特徴をいくつかもっている。その一つは、ターゲット遺伝子を宿主大腸菌の染色体に組み込めることで、図2に示すように、ベクター中央の *att* 部位で宿主染色体の特定の部位(λタイプは大腸菌染色体 17' の領域、φ80 タイプは 27' 領域)で組換えが起こって挿入される。その結果、ターゲット遺伝子は低コピー数となり、その発現は宿主のリプレッサーにより完全に制御可能となる。目的の産物が通常はほとんど生産されないので、組換え体はきわめて安定で、プラスミド型組換え体のようにターゲット遺伝子が脱落してしまう心配はまったくない。したがって、培養に際し薬剤による選択圧をかけなくてよく、スケールアップが容易である。

スリーパーのもう一つの特徴は、ターゲット遺伝子の挿入部位である。ターゲット遺伝子は、ベクターのコート蛋白質遺伝子部分を制限酵素によって除去し、その部分に組み込まれる(図2)。続いて、試験管内でλファージのコート蛋白質にパ

図2 ■ スリーパーベクター概念図

図3 ■ 代表的なスリーパーベクター slp501 S-Km

ッケージし (*in vitro* パッケージ法)、宿主大腸菌に感染させる。細胞内に入った組換え体 DNA は、スリーパー上の遺伝子の働きにより、宿主染色体に組み込まれるのである。

スリーパーベクターには、使用目的に応じ、数多くの種類がある^(4,5)。最も代表的な slp 501 S-Km (図3) はカナマイシン耐性遺伝子をもつが、この耐性マーカーはスクリーニングの時に利用されるだけで、プラスミド株の場合のように培養時に薬剤が添加されることはない。ターゲット遺伝子は *EcoRI* 部位に組み込めるが、その他に、*KpnI* も利用可能であり、23 kb 程度までの外来 DNA を挿入できる。

スリーパーベクターを用いて作った組換え体大腸菌を、筆者らはスリーパー株と呼んでいる。スリーパー株に目的の産物を生産させるには、まず、培養温度を 42°C にシフトし、約 20 分間培養する。この温度ではファージの増殖を抑えていたリプレッサー (*cI₈₅₇* 遺伝子の産物で温度感受性) が失活するため、ファージ増殖の遺伝情報が発現し、組換え体 DNA が宿主染色体より切り出され、自己複製を開始する。

その後の培養により(温度は任意に設定できる)、組換え体 DNA のコピー数は増え続け、ついには細胞当り 500~1,000 コピーにも達する。

それに伴って、ターゲット遺伝子の転写を抑えているリプレッサーの数が不足となり、抑制が解除され、目的の産物が大量に生産される仕組みとなっている。溶菌遺伝子に変異 (S_T) を導入しているので (図 2), 培養中に溶菌は起こらず、生産物は菌体内に蓄積する。集菌後、キレート剤処理すると溶菌し、目的の産物を回収できるのである。

3. スリーパー株によるルシフェラーゼの生産

動物由来の酵素は、大腸菌で活性のない凝集体として生産される例が多い。クローニングされたゲンジボタルルシフェラーゼ cDNA に大腸菌 *trp* プロモーターをつなぎ、プラスミドで発現を試みたところ、幸運にも活性をもつ正常な構造のルシフェラーゼが生産されていることがわかった。

この株の生産するルシフェラーゼは、しかしながら、あまり多くはなく、しかも生産量の大幅な変動がしばしば見られた。発現量を高めるようプラスミドをさらに改変すると、そのプラスミドの安定性が極度に低下し、生産物が宿主に何らかの悪影響を与えている様子である。この系において生産量をさらに高めるためには、何か特別な工夫が必要と思われた。

そこで、プラスミド上のルシフェラーゼ遺伝子部分 (*trp* プロモーターを含む) を制限酵素で切り出し、スリーパーベクター *slp* 501 S-Km に導入した。得られた組換え体 DNA には 4 コピーのルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれており、スリーパー株の生産するルシフェラーゼの量はプラスミド株の約 100 倍に達した。スリーパー株は予想した通りきわめて安定であった。

フラスコ培養の経過を図 4 に示す。培養は 32°C で開始し、42°C、25 分間ヒートインダクション後、29°C で培養を行なったものである。ゲンジボタルルシフェラーゼの場合、インダクション後の培養温度はやや低目のほうが良い結果が得られた。またヘイケボタルの場合、それより少し高めが良かった。このように、誘導後の最適温度は生産される酵素によって変化するので、スリーパーと同様コピー数が温度で変化するランナウェイプラスミド⁽¹⁰⁾と比較した場合、スリーパーのほうが

図 4 ■スリーパー株によるルシフェラーゼの生産
KU: Klett Units

より優れた性能をもつ。ランナウェイや温度感受性リプレッサーで制御されるプロモーターをもつプラスミドベクターなどと違って、スリーパーでは培養温度の高温シフトはほんの一時的で済み、その後の温度は任意に設定できるからである。

スリーパーを用いた生産系では、現在までに数種類の酵素で工業生産に成功し、数トンクラスの培養も行なわれている。動物由来の酵素ではルシフェラーゼが最初のケースであったが、期待通りの性能が示され、ホタルルシフェラーゼの大量供給への道が開かれたわけである。

ホタルルシフェラーゼの利用

1. 何に使えるか

ホタルルシフェラーゼの利用はおおよそ 3 分野に大別されよう。まず第 1 は ATP の測定とその応用分野、第 2 は放射性物質に代わるマーカーとして、そして第 3 に光そのものの利用などである。

第 1 の分野ではすでに利用が行なわれており、今後も着実にその適用範囲が広がっていくものと期待される。ホタルルシフェラーゼによる ATP 測定は、高感度 (10^{-12} M) 広測定域 (3~6 桁) で行なえるため、単に ATP の定量のみならず、ATP の生成/消費を伴う各種酵素反応の鋭敏な検出系として、あるいは微量の生体内 ATP を検出して細菌数などのリアルタイムな測定用にと、幅広い応用分野がある。特に汚染微生物の測定は、生産・流通の各段階で実に多くの潜在需要があるものと予想されている。ここで普及のネックとな

っている問題の一つは、測定機器と測定用キットが比較的高価なことであるが、今後需要が増えるに伴い、急速にコストダウンが可能となろう。

もう一つの問題は、測定の対象によって若干の工夫が必要なことである。たとえば、牛乳中の微生物数の測定には工業用超純水中の微生物チェックに使わ

れる測定法をそのままでは適用できず、そのサンプルに合った前処理が必要である。製造工程などは公にできない場合が多く、どうしても利用する現場で前処理法を開発しなければならず、普及のネックとなっている。

第2の分野では、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として利用した例が有名であるが、ルシフェラーゼそのものを使って酵素免疫測定法(EIA)やDNAプローブ法への適用も考えられ、魅力ある分野として研究開発が進められている。

第3の光そのものの利用については、今後の研究開発に待つべき点が多いが、後に述べるように、発光色の変化した変異体ルシフェラーゼが得られているので、イベントやレジャーでの利用が考えられる。アイデア次第では面白い展開が期待されよう。

2. ルシフェラーゼによる微生物数の迅速な測定

微生物の数は、通常、プレート法を用いて測定される。この方法によれば、生菌数を正確に計れるが、培養にかなり時間を要するので、リアルタイムな測定にはほど遠い。夏場に出荷を急がれる生ビールには、迅速な生菌数チェックが必要であろう。また、銭湯やプールの汚染菌数をプレート法で測定しても、あまり意味がない。

ルシフェラーゼを用いる測定法では、ほんの1～2分で測定が完了するので、ほぼリアルタイムに生菌数の状況を握むことができる。図5に示すように、サンプルにまず、細胞よりATPを取り出すATP放出剤を添加し、30秒間程度置いた後に、ルシフェリンとルシフェラーゼの入った発

図5 ■ ルシフェラーゼ法による微生物数の測定

光試薬を加え、直ちにルミノメーターで測定するだけの操作である。測定値より、別にATP標準液で作っておいた検量線を用い、ATPの量を算出、予めプレート法で求めておいた菌数とATP量の関係より、菌数を算出するのである。ルミノメーターは原理的には液体シンチレーションカウンターと同じで、国産でも高性能のものがある。

ATP放出剤としては、界面活性剤(Triton-X 100など)、酸(トリクロル酢酸など)、および有機溶媒(ジメチルスルホキシドなど)が利用されるが、菌体内ATPのレベルを経時的に調べる場合などには、単なる煮沸によってATPを抽出する方法が簡便である。

スリーパー株で生産されたゲンジボタルルシフェラーゼは、紙パルプ工業で使用される微生物測定キット「ルシフェール-KP」として、1990年に発売(栗田工業株式会社と共同)されたが、このキットにはATP放出剤が添付されている。また、大学の研究室などで手軽にATPを測定するためのキットとして、ATP放出剤を含まない「ルシフェール-LU」、汎用性のあるATP放出剤を加えたキット「ルシフェール-LU プラス」を続いて発売した。

3. 予想される展開

ホタルルシフェラーゼの大量供給が可能となってまだ日も浅く、ルシフェラーゼによって測定可能な項目もまだそれほど多くないので、キット製造数が少なく、製造コストの劇的な低減に至っていない。同じ理由で、ルミノメーターもまだ高嶺の花であるが、今後測定項目が増えれば、分光光

度計のように一般的となり、それに応じてキットも大量生産によるコストダウンが可能となつて、ますます利用しやすくなると思われる。

ところで、生体成分の特異的検出法としては、免疫測定法や DNA プローブ法が知られているが、近年、高価で取り扱いの難しいラジオアイソトープの代わりに酵素で標識する方法が用いられるようになった⁽¹¹⁾。酵素標識法の欠点は感度があまり高

くないことであったが、最近、化学発光や生物発光を利用してその欠点を克服しつつある。

ルシフェリン-O-リン酸は、ホスファターゼの作用により脱リン酸されてはじめてルシフェラーゼの基質となる化合物である。アルカリホスファターゼなどを標識酵素として用いた場合、この化合物を利用してルシフェラーゼによる高感度測定が可能となった⁽¹²⁾。また、酢酸キナーゼやクレアチンキナーゼなどを抗体に結合させ、その作用によって生成する ATP をルシフェラーゼで検出する発光免疫測定法も考案されている⁽¹³⁾。このように、従来ラジオアイソトープが利用されていた分野に生物発光の光が当たりつつあり、特別な施設を必要としないこの方式のさらなる発展に期待したい。

ゲンジボタルルシフェラーゼの人工変異

1. 人工変異のメリット

近年、酵素など蛋白質の一次構造を人工的に改変し、その性質を改良しようという蛋白質工学が盛んに行なわれている。しかしながら、微生物由来の酵素などをそのターゲットとした場合、苦勞して変異酵素を作りあげても、自然界から新たにスクリーニングされた菌株の生産する酵素が、その変異体をはるかに超える優れた性質を示すかも知れないという不安が常にある。

その点、ホタルルシフェラーゼのように、ごく限られた生物のみが生産している蛋白質の場合、

図 6 ■ ルシフェラーゼ生産菌のスクリーニング法

その性質の改良にこの蛋白質工学の手法はきわめて有効であろう。筆者らはすでにこの方法を用い、ゲンジボタルルシフェラーゼの人工変異体をつくつか得ており、その一部を以下に紹介したい。

2. 発光色変異

前に述べたように、ルシフェラーゼの配列はゲンジボタルとヘイケボタルできわめてよく似ていた。ところが、ホタルより精製したルシフェラーゼを用い、発光反応を行なってみると、ゲンジボタルとヘイケボタルとでは光の色に違いがあった。ヘイケボタルのほうがやや青味がかった光を発したのである。このことより、ほんの少し配列を変えるだけで、発光色を変化させられるのではなかろうかと考えた。

そこで、ゲンジボタルルシフェラーゼ cDNA を変異剤処理した後、大腸菌でルシフェラーゼを生産してみた。生産菌をメンブランフィルター上で生育させ、そのフィルターをルシフェリン溶液に浸すとコロニーが光を発する(図 6)。変異剤処理した cDNA をもつ株をこの方法で調べてみると、ごくまれに色が変わった光が出現した。その株よりルシフェラーゼをとり出し発光反応を行なってみると、やはり色が変化しており、この現象がルシフェラーゼ自身の変化によって引き起こされたものであることが確認された。

光の色は主にオレンジや赤など、本来の色

($\lambda_{\max}$ 562 nm, 黄緑)より長波長側に 30~50 nm 移動したものが多かったが,中には短波長側に移ったものもあった.変異体 cDNA の配列を解析してみると,予想をはるかに超え,それらの変異はごく単純なものであった.ルシフェラーゼを構成する 548 アミノ酸のうち,いずれの変異体もただ 1 つのみが変わっていたのである⁽¹⁴⁾.このようにわずかなアミノ酸置換により,どうしてどのように劇的な発光色の変化がひき起こされるのか.現時点では,疑問は山のようにあり,とにかく,結晶構造解析によりその高次構造を調べるところから始めようと考えているところである.

*

筆者らがホタルと付き合うようになったのは,当時開発していたスリーパーベクターを用いて,動物由来の蛋白質を何か作ってみようという単純な動機からであった.その頃,ホタルルシフェラーゼの利用については,ATP の定量以外あまり知られておらず,このターゲットを取り上げるか否かについて,かなり議論があったが,結局,ルシフェラーゼ自身のもつ魅力に負け,とにかく少しの間やってみようということで研究が始まった.幸いにして,その後,微生物数の測定など多くの分野でその利用法が開発され,確たる当てもなく始まったこのテーマもようやく日の目を見るに至った.

生産法についていえば,微生物の系を用いて,

動物由来などあらゆる種類の蛋白質を活性のある形で生産できるかどうかはまだ微妙であり,特に高次構造の形成に解決すべき問題が残されているように思える.大量供給が可能となったホタルルシフェラーゼが,今後広く愛用されることを願い,蛋白質工学によってさらに優れたルシフェラーゼをつくり上げたいと考えている.

最後に,本稿を執筆する機会を与えて下さった東北大学農学部一島英治教授に感謝いたします.

文献

- 1) 笠井佐夫, 渡辺治夫: 蛋白質 核酸 酵素, 32, 1234 (1987).
- 2) 中野衛一: バイオサイエンスとインダストリー, 46, 3190 (1988).
- 3) T. Masuda, H. Tatsumi & E. Nakano: *Gene*, 77, 265 (1989).
- 4) 中野衛一: 蛋白質 核酸 酵素, 32, 1133 (1987).
- 5) 松山 旭, 中野衛一: 蛋白質 核酸 酵素, 35, 2348 (1990).
- 6) 梶山直樹, 中野衛一: 第 13 回日本分子生物学会年会講演要旨集, p.298 (1990).
- 7) J. R. DeWet *et al.*: *Mol. Cell. Biol.*, 7, 725 (1987).
- 8) 梶山直樹, 辰巳宏樹, 中野衛一: 日本農芸化学会 1990 年度大会講演要旨集, p.202 (1990).
- 9) 梶山直樹, 増田 力, 辰巳宏樹, 中野衛一: 日本農芸化学学会昭和 63 年大会講演要旨集, p.316 (1988).
- 10) B. E. Uhlin & K. Nordstrom: *Mol. Gen. Genet.*, 165, 167 (1978).
- 11) 北川常廣, 南原利夫, 辻 章夫, 石川榮治編: “酵素免疫測定法”, 蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31 (1987).
- 12) W. Miska & J. R. Geiger: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 25, 23 (1987).
- 13) 池田ひろみ, 前田昌子, 辻 章夫, 中島基雄: 日本薬学会第 111 年会講演要旨集 3, 223 (1991).
- 14) N. Kajiyama & E. Nakano: *Protein Eng.*, 4, No.5, in press (1991).

お知らせ

レチノイドシンポジウム (第 3 回)

日程: 平成 3 年 12 月 6 日 (金), 7 日 (土)

会場: 薬学会館 (東京)

討論主題: ビタミン A 酸をはじめとするレチノイドの生命維持, 形態形成, 細胞の増殖や分化, 癌との関連に関する研究を討論の主題とするシンポジウムを計画しております. 数名の外国招待研究者に加えて, 国内より約 40 題の演題 (討論を含めて約 15 分を予定) を募集いたします.

講演申込要領: ①講演題目, ②研究者氏名 (講演者に○印), ③所属研究機関, ④連絡先 (TEL) を, 申込受領通知用の葉書 (宛名明記のもの) とともに下記連絡先にご送付下さい.

講演申込締切: 平成 3 年 7 月 10 日 (水)

講演要旨締切: 平成 3 年 9 月 30 日 (月)

連絡先: 〒113 東京都文京区弥生 1-1-1

東京大学応用微生物研究所 橋本祐一

☎ 03-3812-2111 ext. 7849

お知らせ

公益信託・成茂動物科学振興基金 平成 3 年度研究助成

助成の対象: 基礎的な動物科学の研究.

助成の内容: 上記研究に対し, 助成金を交付する. 助成金額約 600 万円. 1 件につき 100 万円程度までとする. 助成金は, 備品, 消耗品, 謝金, 国内旅費などのほか, 国外旅費にも使うことができる.

応募の方法: 所定の研究助成申込用紙に必要事項を記入して, 当公益信託に直接申し込む.

申込締切: 平成 3 年 8 月 19 日 (月) 必着.

問合せ・申込用紙請求先:

公益信託・成茂動物科学振興基金

〒100 東京都千代田区丸の内 1-4-5

三菱信託銀行本店営業部法人相談室

☎ 03-3212-1211 内線 4062