

第8回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

最近の遺伝子改変家畜の現況, とくに植物遺伝子を利用した家畜の脂質の改変

佐伯 和弘

近畿大学 生物理工学部 遺伝子工学科 先端技術総合研究所

遺伝子導入家畜の歴史と現況

1980年にGordonらは、環状DNAをマウス前核に顕微注入して初めて遺伝子導入個体を作製した[1]。さらに、導入遺伝子はメンデルの法則に従い次世代へと受け継がれること[2]が示されて以来、動物への外来遺伝子導入方法として受精卵前核への遺伝子顕微注入法が一般的となった。その後、Palmiterら[3]は、成長ホルモン遺伝子を導入したマウスが大型化することを報告し、組換えDNAの導入による遺伝子の過剰発現が動物個体の形質を転換しうることが明らかになった。マウスでの成功が契機となって家畜でも外来遺伝子を導入してその形質を転換した家畜、トランスジェニック家畜、が作出されるようになった。中型家畜であるウサギ、ヒツジおよびブタにおける遺伝子(成長ホルモン)導入の成功例は、1985年に報告されている[4]。1989年には、Roschlauら[5]がウシで初めての遺伝子導入の成功例を報告した。その後、ウシの体外成熟・受精・発生技術の向上とルーチン化が進んだことでウシ胚を体外で容易に生産できるようになり、1991年にはこの体外受精技術を応用したトランスジェニックウシが生産された[6]。これらの受精卵前核への遺伝子注入法は、導入遺伝子が、偶然ホストゲノムに取り込まれることを期待する方法のため、遺伝子の導入効率は非常に低く、マウスで2.5%程度、ウシでは0.06%程度にすぎない[7]。遺伝子顕微注入法は、トランスジェニック動物作製法として確立された方法として定常的に利用されているが導入効率が低いこと、さらに導入される遺伝子のコピー数や導入部

位の制御が困難なことなどの欠点がある。また、ウシでは、モザイク状のトランスジェニック個体が多いことも報告されている[6,7]。

Schniekeら[8]は、体細胞クローン技術を用いてヒツジ・ラクトグロブリン・プロモーター/ヒトファクターIX融合遺伝子をあらかじめ導入したヒツジ胎子線維芽細胞を用いて、トランスジェニッククローンヒツジ(ポリリー)の作出に成功した。この報告によると、前核期胚への遺伝子顕微注入法に比べ、2.5倍の効率でトランスジェニックヒツジが作製できることが示された。1998年には、ウシ[9]およびヤギ[10]で、同様にクローン技術を用いたトランスジェニック動物の作出が報告されている。

家畜における初期の報告では、成長ホルモン遺伝子導入による個体サイズの大型化[3]を目的としていたが、マウス以外ではほとんど大型化せず、ブタでは飼料効率は向上したものの代謝が促進し逆に背側脂肪が薄くなったことが報告されている[11]。最近では、環境汚染の低減や耐病性の付与の観点からの報告がある。環境汚染の低減としては、Phytaseを唾液腺から分泌する遺伝子導入ブタが報告されている[12]。Phytaseはフィチン酸リンからリンを遊離する酵素である。遺伝子導入技術によりPhytaseを唾液腺から分泌する遺伝子導入ブタを作製し、リンによる環境汚染の低減を目指したものである。耐病性の付与では、ウシの乳中に黄色ブドウ球菌に対し殺菌作用のあるlysostaphinを分泌する遺伝子導入ウシが報告されている[13]。lysostaphinは、*Staphylococcus simulans*が生産するpeptidoglycan

hydrolaseで、黄色ブドウ球菌の細胞壁を分解する。このことから、lysostaphin 遺伝子を乳腺特異的に発現する乳牛を作製し、これら遺伝子導入ウシは乳腺内で lysostaphin を産生し、黄色ブドウ球菌耐性となっている。

一方、家畜をタンパク質生産工場いわゆる“バイオリアクター”とみたとて乳中に医薬品を生産させるトランスジェニック動物、およびヒトでの移植用臓器の生産を目的としたトランスジェニック動物に関する研究が進められている。1987年、Simonsら[14]およびGordonら[15]は、遺伝子導入したマウスの乳中に医薬品を分泌させることに成功した。動物の乳中に生理活性物質を分泌させるためには、ふつう、乳腺特異的に構造遺伝子が発現するように、乳タンパク質のプロモーター領域を融合させた遺伝子が利用されている[16]。構造遺伝子としては、有用な医薬品タンパク質をコードする遺伝子が多く利用されている。嚢胞性線維症・糖尿病・血友病・多発性硬化症などの疾患治療薬や血清アルブミンなどの代用血液などを乳中に分泌する家畜の生産を目的としたいくつかのベンチャー企業が設立された。最近では、ヒト抗体を生産できるヒト抗体人工染色体を移入したウシが生産されている[17]。ヒト免疫グロブリンを生産させるためにヒト抗体遺伝子座を導入したウシ体細胞によるクローンウシが作製されている。この研究グループでは、ウシ血清からのヒト抗体精製の妨げとなるウシ抗体やヒトへの適応に妨げとなる

異常プリオンの混入をさけるため、ウシ抗体およびプリオン遺伝子を破壊した体細胞の作製についても報告している[18]。

遺伝子導入家畜による食への貢献の可能性

緒言

最近、先進国を中心とした飽食による生活習慣病の蔓延が問題視されている。日本においても、近年の食習慣の北米化傾向により、飽和脂肪酸が多く不飽和脂肪酸の少ないウシやブタなどの動物性脂肪を過剰に摂取することで冠動脈疾患や血栓性疾患の罹患率が上昇している。また、私たちの研究グループでは、今までの育種改良技術では解決できない食糧問題を遺伝子工学的手法による家畜の改変により達成できないかと考えている。

脂肪を構成する脂肪酸

ウシやブタなどの畜肉を中心に食事をするデンマーク人には心筋梗塞で死亡する人たちが多いが、同じデンマークでも主に魚を食するイヌイットの人たちには心筋梗塞での死亡率が非常に低いことが知られていた。1960～70年代に行われた疫学的な調査の結果、イヌイットの人たちは、エイコサペンタエン酸(EPA, 20:5n-3)とドコサヘキサエン酸(DHA, 22:6n-3)を魚や海獣から多く摂取していたことが分かった[19]。ウシやブタなどの陸生動物の脂肪にはこれら高度不飽和脂肪酸が少ない。図1に脂肪酸

脂肪酸合成経路(植物と動物の比較)

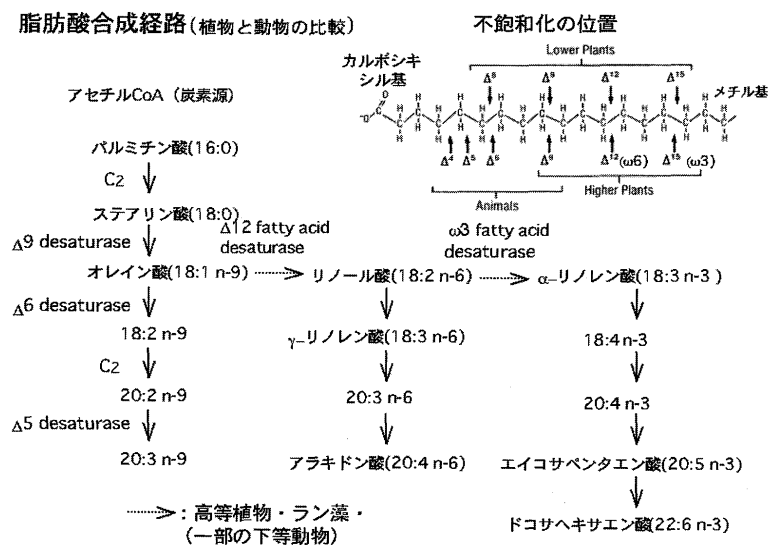


図1.

合成経路を示した。ふつう、パルミチン酸 (16:0) から、炭素鎖延長と不飽和結合の導入により、数多くの脂肪酸が合成される。哺乳動物には脂肪酸の D5, D6 および D9 の位置に不飽和結合を導入する酵素活性があるため、オレイン酸 (18:1) が生合成できる。しかしながら、D12 (w6) および D1 (333) の位置に不飽和結合を導入する酵素を欠いているため、リノール酸 (18:2n-6) やリノレン酸 (18:3n-3) 等の n-6 系および n-3 系脂肪酸を合成できない。そのため、ヒトを含む哺乳動物は、それらの脂肪酸を必須脂肪酸として食餌から摂取する必要がある。高等植物やラン藻 [20]、下等動物の線虫 [21] やゴキブリ [22] には、n-6 系および n-3 系脂肪酸を合成できる酵素活性を有している。魚類や海獣に高度不飽和脂肪酸が多いのは、それら動物自体が合成しているのではなく、植物プランクトンを原点とする食物連鎖の頂点にあるため、EPA や DHA などの高度不飽和脂肪酸をその体脂肪に多く蓄積しているためと考えられている。

このイヌイットの食事と心筋梗塞との関連を示した研究結果をもとに、アメリカの高コレステロール血症の食餌療法指針では、飽和脂肪酸の多い動物性脂肪の摂取量を下げ、不飽和脂肪酸が多く含まれる植物性脂肪摂取量を増加させることが推奨されている [23]。このため、今まで、家畜の脂肪中の多価不飽和脂肪酸含量を増大させるため多くの研究がなされてきた。ブタに常時大量に魚油を摂取させると脂肪組織中の多価不飽和脂肪酸含量が増大する [24] が、一過性であり精製魚油が非常に高価なことが欠点である。またウシなどの反芻動物では不飽和脂肪酸含量の多い飼料を投与しても、多価不飽和脂肪酸含量はほとんど増大しないことが知られている [24]。そこで私たちは、植物がもつ脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を動物に導入することで、体内でその遺伝子を発現させ、新規に不飽和脂肪酸を産生させることを考えた。

植物由来脂肪酸不飽和化酵素遺伝子は哺乳動物で機能するか？

脂肪酸不飽和化酵素には、acyl-ACP 不飽和化酵素、acyl-CoA 不飽和化酵素、および acyl-lipid 不飽和化酵素の 3 種類が知られている [20]。acyl-ACP 不飽和化

酵素は、植物の葉緑体 (あるいはプラスチド) のストロマに存在し、アシルキャリアータンパク質 (ACP) と結合した脂肪酸を基質とし電子供与体としてフェレドキシンを利用している。acyl-CoA 不飽和化酵素は、動物、酵母および真菌にみられ、小胞体膜に結合したタンパク質で、補酵素 A (CoA) と結合した脂肪酸を基質とする。電子供与体としては、シトクロム b_5 を利用している。acyl-lipid 不飽和化酵素は、高等植物とラン藻に存在し、リン脂質などの極性脂質の脂肪酸を基質とする。この酵素は小胞体膜あるいは葉緑体膜に結合したタンパク質で、電子供与体として、それぞれ、シトクロム b_5 あるいはフェレドキシンを利用する 2 種類が知られている。また、acyl-CoA 不飽和化酵素は、脂肪酸炭素鎖の D9 位以降に不飽和結合を導入する酵素が存在しない。acyl-ACP 不飽和化酵素は電子供与体としてフェレドキシンを利用するため、動物細胞内では機能しないと考えられる。したがって、今回、私たちは植物の脂肪酸不飽和化酵素のうち動物と共通する小胞体膜結合型の acyl-lipid 不飽和化酵素を利用することを考えた。不飽和結合の位置としては、動物細胞が脂肪酸炭素鎖の D9 位まで不飽和化させる酵素活性を有しているので、D12 を不飽和化する acyl-lipid 不飽和化酵素 (FAD2) を選択した。また、植物でも私たちが野菜として良く摂取するハウレンソウからこの FAD2 酵素の遺伝子を取得して用いた。

ハウレンソウ由来 FAD2 遺伝子のブタへの導入

ハウレンソウ由来 FAD2 遺伝子を導入する動物には、脂肪を多く蓄積し食肉として最も一般的なブタを選んだ。FAD2 遺伝子は、脂肪細胞で発現するように、脂肪細胞特異的プロモーターである adipocyte P2 (*aP2*) プロモーター [25-27] と連結した融合遺伝子 (*aP2/FAD2*) を用いた。過剰排卵したブタから 464 個の受精卵を回収し、受精卵前核に *aP2/FAD2* 遺伝子を注入し、16 頭の受卵雌に移植した。これら受卵雌を分娩まで飼育し、70 頭の産子を得た。Southern blot 解析の結果、6 頭の遺伝子導入ブタが得られた。3 頭が死亡したため、最終的に 3 頭の遺伝子導入ブタが得られた。背側脂肪組織の RT-PCR による発現解析の結果、2 頭のブタで FAD2 遺伝子の発現が認められた。

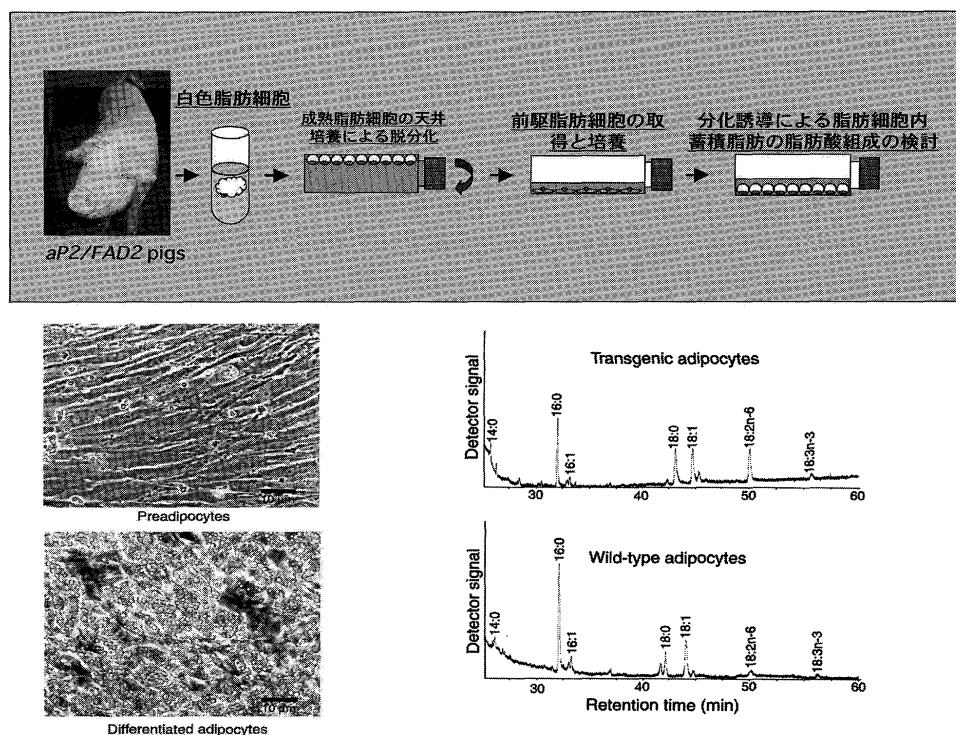


図2. 体外で再分化させた *aP2/FAD2* ブタ脂肪細胞内の脂質中リノール酸組成

aP2/FAD2 遺伝子の機能的発現の解析

この *aP2/FAD2* 遺伝子導入ブタ内で導入した *aP2/FAD2* 遺伝子が機能的に発現しているかどうかを調べた。背側の脂肪組織を採取し、体外で脱分化させることで前駆脂肪細胞を得た。これら細胞を体外培養で増やし、再度分化させることで脂質を蓄積させた。この脂質の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより測定した。その結果リノール酸 (18:1) 組成比は、野生型が1.9%であったが、遺伝子導入ブタでは20.3%と約10倍であった。このことは、導入したハウレンソウ由来の *FAD2* が遺伝子導入ブタ細胞内で機能的に発現し、オレイン酸 (18:1) をリノール酸 (18:2n-6) に変換したことを実証したものである。

さらに、遺伝子導入ブタを野生型ブタと交配し、21頭の次世代を生産したところ、8頭が遺伝子導入動物であったことから、*aP2/FAD2* 遺伝子がメンデルの法則に従って伝達されていた。また、主要臓器での *FAD2* 遺伝子発現を Northern blot 解析で調べたところ、脂肪組織特的に発現していることが示された。

今後の展開

それでは、このリノール酸を新規に合成するブタを家畜として生産し、私たちが食することが健康によいのだろうか。実はリノール酸は必須脂肪酸であるので必ず摂取しなければならないが、先進国では摂取過剰になっている。約100-150年前まで、人類はリノール酸やアラキドン酸などのn-6系脂肪酸と α -リノレン酸、EPAやDHAなどのn-3系脂肪酸をほぼ等量ずつ摂取してきた[28]。ダイズやトウモロコシなどの陸生植物はリノール酸を含むn-6系脂肪酸を高率に含有している。その結果、現在の人類はn-6系脂肪酸を150年前の20~30倍も摂取している[28]。この過剰摂取がアレルギー疾患などを引き起こしていると言われている。このことから、私たちの研究グループでは、脂肪にn-3系脂肪酸を多く蓄積させた家畜を作れば、脂肪酸をバランス良く摂取できるようになり生活習慣病の予防に寄与できると考え多。現在、動物には存在しないもう一つの脂肪酸不飽和化酵素であるw3脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子 (*FAD3*) を家畜に導入することを計画している。

生産性向上を目的とした遺伝子改変生物を第一世代とすれば、ここで述べてきた消費者の健康に寄与

できる遺伝子改変生物は第二世代の遺伝子改変技術といえる。すでに、分解されるとビタミンAや抗酸化物質となる β -カロチンを多く含むイネやオレイン酸を多く含むダイズが遺伝子組換え技術で商業的に生産され、消費されている。これら遺伝子改変食品の研究開発は、今までの品種改良技術と組み合わせることとで、食糧増産はもとより消費者の健康に寄与する食品を生産できると確信している。

謝辞

FAD2 遺伝子導入ブタの研究は、基礎生物学研究所・村田紀夫先生、三上浩二先生、鈴木石根先生、田坂恭嗣先生（現：産総研）、帯広畜産大学・木下幹朗先生、日本大学・加野浩一郎先生、YS研究所・平林真澄先生（現：生理学研究所）、柏崎直巳先生（現：麻布大学）および近畿大学（松本和也、田口善智、細井美彦、入谷 明）の共同研究で行われた。また、本研究は、日本学術振興会・未来開拓学術研究事業、文部科学省・21世紀COEプログラム、および科学技術振興機構・和歌山県地域結集型共同研究事業の研究助成金により行われた。

参考文献

- 1) Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7380-7384.
- 2) Gordon JW, Ruddle FH. Mammalian gonadal determination and gametogenesis. *Science* 1981; 211: 1265-1271.
- 3) Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 1982; 300: 611-615.
- 4) Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Jr., Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 1985; 315: 680-683.
- 5) Roschlau K, Rommel P, Andreewa L, Zackel M, Roschlau D, Zackel B, Schwerin M, Huhn R, Gazarjan KG. Gene transfer experiments in cattle. *J Reprod Fertil Suppl* 1989; 38: 153-160.
- 6) Krimpenfort PA, Rademaker A, Eyestone W, Van der Schans A, Ven den Broek S, Koolman P, Kootwijk E, Plakenburg G, Peiper F, Stijker R, De Boer H. Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production. *Bio/Technology* 1991; 9: 844-847.
- 7) Eyestone WH. Production and breeding of transgenic cattle using in vitro embryo production technology. *Theriogenology* 1999; 51: 509-517.
- 8) Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997; 278: 2130-2133.
- 9) Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; 280: 1256-1258.
- 10) Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destremes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 456-461.
- 11) Pursel VG, Pinkert CA, Miller KF, Bolt DJ, Campbell RG, Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE. Genetic engineering of livestock. *Science* 1989; 244: 1281-1288.
- 12) Golovan SP, Meidinger RG, Ajakaiye A, Cottrill M, Wiederkehr MZ, Barney DJ, Plante C, Pollard JW, Fan MZ, Hayes MA, Laursen J, Hjorth JP, Hacker RR, Phillips JP, Forsberg CW. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 741-745.
- 13) Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, Wells KD, Talbot N, Hawk HW. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 445-451.
- 14) Simons JP, McClenaghan M, Clark AJ. Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice. *Nature* 1987; 328: 530-532.
- 15) Gordon K, Lee E, Vitale JA, Smith AE, Westphal H, Hennighausen L. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio/Technology* 1987; 24: 425-428.
- 16) Wall RJ, Kerr DE, Bondioli KR. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. *J Dairy Sci* 1997; 80: 2213-2224.
- 17) Kuroiwa Y, Kasinathan P, Choi YJ, Naeem R, Tomizuka K, Sullivan EJ, Knott JG, Duteau A, Goldsby RA, Osborne BA, Ishida I, Robl JM. Cloned transchromosomal calves producing human

- immunoglobulin. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 889-894.
- 18) Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, Sathiyaselan J, Sullivan EJ, Kakitani M, Tomizuka K, Ishida I, Robl JM. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. *Nat Genet* 2004; 36: 775-780.
- 19) Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet* 1978; 2: 117-119.
- 20) Los D, Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1394: 3-15.
- 21) Peyou-Ndi MM, Watts JL, Browse J. Identification and characterization of an animal D12 fatty acid desaturase gene by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 2000; 376: 399-408.
- 22) Borgeson CE, Kurtti TJ, Munderloh UG, Blomquist GJ. Insect tissues, not microorganisms, produce linoleic acid in the house cricket and the American cockroach. *Experientia* 1991; 47: 238-241.
- 23) Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). *Jama* 1993; 269: 3015-3023.
- 24) Wood J, Enser M. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *Br J Nutr* 1997; 78 Suppl 1: 49-60.
- 25) Ross SR, Graves RA, Spiegelman BM. Targeted expression of a toxin gene to adipose tissue: transgenic mice resistant to obesity. *Genes Dev* 1993; 7: 1318-1324.
- 26) Ross SR, Graves RA, Greenstein A, Platt KA, Shyu HL, Mellovitz B, Spiegelman BM. A fat-specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P2 *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9590-9594.
- 27) Graves RA, Tontonoz P, Ross SR, Spiegelman BM. Identification of a potent adipocyte-specific enhancer: involvement of an NF-1-like factor. *Genes Dev* 1991; 5: 428-437.
- 28) Bemelmans WJ, Muskiet FA, Feskens EJ, de Vries JH, Broer J, May JF, Jong BM. Associations of alpha-linolenic acid and linoleic acid with risk factors for coronary heart disease. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54: 865-871.