植物遺伝子による n-3 系多価不飽和脂肪酸を生合成する 形質転換家畜の生産

Production of Transgenic Livestock with n-3PUFAs Synthesized *de-novo* and Stored by Introduction of Plant Genes

印藤頼子

近畿大学大学院生物理工学研究科
生物工学専攻
〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
(現所属：国立長寿医療センター研究所)

Yoriko INDO

Division of Biological Science,
Graduate School of Biology-Drienteel
Science and Technology, Kinki
University
930 Nishimitani, Kinokawa-city,
Wakayama 649-6493, JAPAN

佐伯和弘

近畿大学大学院生物理工学研究科
生物工学専攻
〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

Kazuhiro SAEKI

Division of Biological Science,
Graduate School of Biology-Drienteel
Science and Technology, Kinki
University
930 Nishimitani, Kinokawa-city,
Wakayama 649-6493, JAPAN

論文要旨：近年，食生活においてウシやブタなどの家畜由来の脂肪を多く摂取するようになったことから，家畜に多い飽和脂肪酸が原因の一端といわれている生活習慣病が増加している。エイコサペンタエン酸 (EPA, 20:5n-3) やドコサヘキサエン酸 (DHA, 22:6n-3) などの n-3 系多価不飽和脂肪酸 (n-3PUFA) には，動物実験や疫学的調査から，血栓性疾患やガン，炎症性疾患などの生活習慣病の予防効果が認められていることから，n-3PUFA を食事からより多く摂取することが推奨されている。しかしながら，n-3PUFA は魚，アザラシなどの海獣やアマニ油などの特定の植物油には多く含まれているが，牛肉や豚肉に含まれる脂肪と置き換えられるほど多く摂取することは，食生活上困難である。そこで，われわれの研究グループでは，n-3PUFA を容易に摂取できるように，遺伝子組換え技術を利用して植物の ω 3 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を家畜に導入し，n-3PUFA を多く含有する家畜を作出することを考えた。ここでは，動物への植物由来脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の導入とその機能的発現に関するわれわれの最近の研究を中心に報告する。

Abstract: Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) are considered desirable in human diets because they can lower the risk of lifestyle-related diseases such as coronary artery disease, cancer and inflammatory diseases. However, recent Western diets are greasy and contain fats rich in saturated fatty acids derived from animal meats, pork and beef. Foods derived from fish, sea animals such as earless seal and specific seed oils, flax and perilla, are rich in n-3PUFA, and are recommended to be ingested. Domestic pigs and cattle cannot synthesize the unsaturated fatty acids such as linoleic acid (18:2n-6) and α -linolenic acid (18:3n-3) because mammals lack the genes for n-6 and ω -3 fatty acid desaturases. We have demonstrated that a plant gene for Δ 12 fatty acid desaturase can function in transgenic pigs. Therefore, enhancement of level of n-3PUFAs in animal meats could be performed by introducing plant-derived gene for ω -3 fatty acid desaturase into domestic animals. Here we discuss our recent work for producing transgenic livestock that *de-novo* synthesize and stored n-3PUFAs using the transgenic technology.

Key words: n-3PUFA, FAD3, transgenic livestock, omega-3 fatty acid desaturase, α -linolenic acid

1 緒言

連絡者：佐伯和弘
E-mail : saeki@waka.kindai.ac.jp

脂質は，われわれの栄養にとって重要なエネルギー源

であるとともに旨味の一つであり、近年の食文化の欧米化、飽食化によってその摂取量は増加している。それにとともに、動物性脂肪を過剰に摂取することにより冠動脈疾患や血栓性疾患などの生活習慣病の発生率が増加している。n-3系多価不飽和脂肪酸 (n-3PUFA) には、虚血性心疾患による死亡率の低減^{1, 2)}、抗炎症作用、抗血栓性疾患³⁾、ガン増殖・発ガン抑制^{4, 5)} など、さまざまな生活習慣病の予防効果があることが報告されている。これら n-3PUFA は、アマなどの一部の陸生植物、魚や海獣などの海生動物に多く含まれているので、畜肉類の摂取を控え魚肉や植物性油の摂取を増やせば、n-3PUFA の摂取割合を増加できる。しかし、旨味として定着した動物性脂質に偏った食習慣を変えることは、非常に困難である。

この健康に対する有効性が注目された n-3PUFA は、摂取が推奨されるとともに、含量の多い食品の開発がすすめられている。哺乳動物はリノール酸 (18:2n-6) および α -リノレン酸 (18:3n-3) を合成する脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を欠いているため、体内で n-6 および n-3 系必須脂肪酸を合成することができない。そのため、陸生の動物性脂肪組織内の多価不飽和脂肪酸、とくに n-3PUFA の含量は非常に少ない。多価不飽和脂肪酸含量を増加させるために、家畜の飼料にこれら多価不飽和脂肪酸を添加し、動物個体の脂肪組織や、乳や卵へ移行させる試みがされてきた。ブタやニワトリなどの単胃動物では不飽和脂肪酸含量の高い飼料を給与することで、脂肪中の脂肪酸組成の変更がある程度可能であることが示されている⁶⁾。一方で、反芻動物であるウシやヒツジでは、第一胃内のルーメンバクテリアにより食餌中の不飽和脂肪酸への水素添加が行われるため不飽和脂肪酸含量の高い食餌を投与しても体脂肪の脂肪酸は飽和脂肪酸含量が高いまま維持される⁶⁾。われわれは、最近、ブタへホウレンソウ根部由来の $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子である *FAD2* 遺伝子を導入し、*FAD2* 遺伝子組換え動物の脂肪組織において 18:2n-6 の含量が増加することを示した⁷⁾。また、Kang *et al.* (2004) は、線虫由来の $\omega 3$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子である *fat-1* を導入したマウスにおいて n-3PUFA 含量の増加を示している⁸⁾。したがって、食餌による脂肪酸組成変更が困難なウシなどの反芻動物では脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を導入することで個体の脂肪酸組成を変更することができると考えた。

外来遺伝子を哺乳動物に導入する方法としては、受精卵前核へ遺伝子を直接注入する遺伝子顕微注入法が古くから広く利用されている。しかしながら、この方法では、ウシでは遺伝子組換え効率が 0.06% と極端に低く、その作製は困難を極めた⁹⁾。1998 年になり、この低い遺

伝子組換え効率を改善するために、あらかじめ遺伝子を導入した体細胞を用いてクローンウシを作出することで、効率的に遺伝子組換え動物を生産できることが実証された¹⁰⁾。

以上の近年の技術的進展を利用して、われわれは、陸生植物でもっとも α -リノレン酸 (18:3n-3) 含量の多いアマ種子から $\omega 3$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*FAD3*) を単離し、さらに体細胞クローン技術を利用して n-3PUFA を新規に生合成できる遺伝子導入家畜の作出についての研究を展開している。本稿ではその一端について述べる。

2 n-3PUFA の疫学的調査

古くから欧米諸国では、動脈硬化性疾患、とくに心筋梗塞による死亡率が高かったため、動脈硬化による心筋梗塞の頻度の多い国と少ない国との間の食生活の相違が疫学的に検討されていた。その結果、脂肪摂取量が虚血性疾患による死亡率と関係があるのではないかと仮説が提出された¹¹⁾。これがきっかけとなり、アメリカ、フィンランド、オランダ、イタリア、ユーゴスラビア、ギリシャ、日本の 7 カ国が参加した 10 年間に渡る研究が進められた (Seven Country Study¹¹⁾)。その報告の中で、飽和脂肪酸摂取量の割合と冠動脈死の関係を見た成績では、飽和脂肪酸の摂取の増加は冠動脈死と相関するとされ、飽和脂肪酸の摂取量の増加に比較して、冠動脈死が増加するということが明らかにされた。さらに、1960～70 年代にグリーンランド・イヌイットとデンマーク人を比較する疫学調査が行われた。グリーンランド・イヌイットの冠動脈死亡率はデンマーク人の 1/7 しかなかった。イヌイットもデンマーク人も食事を通じての脂肪摂取量は多く、さらにコレステロール摂取量はデンマーク人よりむしろイヌイットの方が多かった。しかしながら、イヌイットは血清コレステロール値、中性脂肪値が低く、デンマーク人の 4 倍も n-3PUFA を摂取しており、n-6 系多価不飽和脂肪酸の方はデンマーク人の半分であった。飽和脂肪酸もイヌイットはデンマーク人の半分であり、そのかわり多価不飽和脂肪酸と一価不飽和脂肪酸 (オレイン酸 (18:1n-9)) の占める割合が高くなっていることが示された²⁾。このことからイヌイットの冠動脈死の少ない理由として、n-3PUFA に富んだ魚類やアザラシ、トドなどの海生動物を主食とするためであるという結論が導かれた²⁾。

わが国でも疫学調査が行われ、魚類中心の食事と動脈硬化性疾患のかかわりについて一定の成績が得られている¹²⁾。1977～1980 年の 4 年間での虚血性心疾患および脳血管障害による死亡率は、漁村地区より農村地区が高

値であった¹²⁾。また、血栓症の発症関連因子の一つとして注目されている血液粘度については、漁村の住民の方が農村の住民に比べ血液粘度が有意に低かった¹³⁾。さらに、n-3PUFA 摂取と心臓、脳血管系疾患における死亡率と魚肉摂取人口の多さとの間には有為な逆相関があることが明らかにされている¹⁴⁾。これらのことから、魚肉の摂取量と n-3PUFA 酸摂取量が虚血性心疾患などの血栓性疾患による死亡率に影響を与えていることが考えられた¹⁵⁾。

3 n-3PUFA 含量の高い家畜の作出

疫学的調査により、n-3PUFA が生活習慣病の予防に効果的であることが示されたことから、家畜や家禽の n-3PUFA 含量を増やす研究が盛んに行われている¹⁶⁾。家禽、とくにニワトリでは飼料に含まれる脂肪の量が卵黄の脂肪量に直接関連することから、飼料に α -リノレン酸 (18:3n-3) が豊富なアマを添加することで“オメガ3 強化卵”が作られている¹⁷⁾。Caston らの報告では、ニワトリの餌にアマニ油を 10% 加えると、卵黄の α -リノレン酸 (18:3n-3) 含量が 10 倍に増加し、20% では 20 倍以上に増加するとしている¹⁸⁾。現在では n-3PUFA の含量の多い鶏卵は徐々に普及しており、通常の卵の約 12 倍の n-3PUFA が含まれるようになっている。また、鶏卵以外でも、飼料にアマニ油を加えると、鶏肉の組織内においても α -リノレン酸 (18:3n-3) が増加することも示されている¹⁹⁾。

一方、ブタにおいても飼料にアマニ油、魚粉や魚油を添加して、精肉の n-3PUFA 含量を増やす試みがされた。魚油を常時大量にブタに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ことがわかったが、同時に魚の匂いが肉についてしまうという欠点が生じた⁶⁾。一方、アマニ油を給餌したブタでは、背脂肪、腎臓脂肪、胸最長筋および肝臓などの臓器で n-3PUFA が増加していた²⁰⁾。

ウシにおいても乳や肉に n-3PUFA 含量を増やそうという試みがなされている。乳牛の飼料にアマニ油を加えるとわずかではあるが牛乳とその製品のチーズ、バターなどに n-3PUFA 含量が増加したことが報告されている²¹⁾。一方、ニワトリやブタなどの単胃動物とは異なり、ウシなどの反芻動物では、多価不飽和脂肪酸含量の多い飼料を投与しても、不飽和脂肪酸は第一胃内に存在するバクテリアにより水素添加され多くは飽和脂肪酸となることで、結果的に乳肉内の多価不飽和脂肪酸含量が増大しにくい。この水素添加を受けないよう油脂をカプセル化したり、脂肪酸カルシウムとするルーメンバイパス法が考案されている^{22, 23)}。また、牛肉においてはアマ

ニ油や魚油を食餌に混ぜることで、 α -リノレン酸 (18:3n-3) だけでなく EPA (20:5n-3) も増加したことが報告されている²⁴⁾。しかし、脂肪酸組成が変化したのは筋肉組織だけで脂肪組織では増加は認められていない。生活習慣病の予防には、食餌中脂質の 5 ~ 10% を n-3PUFA として摂取する必要がある²⁵⁾、このためには筋肉の脂肪酸組成だけでなく、もっとも脂肪量の多い脂肪組織の脂肪酸組成を改変する必要がある。

4 遺伝子工学的手法を用いた肉質の改善

家畜や作物の生産性の向上は遺伝的な選抜・育種選抜法によって行われ、目覚ましい改良がなされてきた。しかしながら、育種選抜法による改良には膨大な時間と作業が必要とされる。このような問題を解決する方法として、近年、遺伝子工学的手法が導入されており、植物では GM 作物として今や一般的に利用されている。哺乳動物では、マウスなどでは組換え DNA を受精卵に導入して作製した遺伝子組換え動物が、主に研究用途で利用されている。この遺伝子組換えマウスは、1980 年にプラスミド DNA をマウス前核に顕微注入して初めて作製された²⁶⁾。その後、クローニングした多くの遺伝子を導入した遺伝子組換え動物、特定の遺伝子を破壊したノックアウトマウスが作製され、遺伝子の動物個体への生理的影響や機能を解析できるようになった。これらの遺伝子組換え技術を家畜に応用することで、肉量の増大化、耐病性の付与などの技術が開発されている^{27, 28)}。

近年では、遺伝子工学的手法の用途は、生産コストの減少や生産量の増加を目的とした生産者の利点を中心とした利用から、医薬品生産や健康によい乳肉の提供などの消費者の利点を考えた利用へ変化している。われわれの研究室では、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を用いて家畜の肉質を改善し、人の健康に寄与できる家畜の作出を試みている。手始めに、哺乳動物で欠いている脂肪酸不飽和化酵素遺伝子が哺乳動物体内で機能するかどうかを検討した。遺伝子はホウレンソウ根部由来のリノール酸 (18:2n-6) の生成にかかわる $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子 (*FAD2*) を用いた。上述のマウスと同様の手法で *FAD2* 遺伝子をブタに導入し、体内で新規にリノール酸 (18:2n-6) が生合成されるかなどの機能的発現を検討した⁷⁾。*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*) プロモーターと連結した。過剰排卵したブタから 464 個の受精卵を回収し、受精卵前核に作製した融合遺伝子 (*aP2/FAD2*) 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 頭の遺伝子組換えブタが得

られた。しかし、3頭が死亡したため、最終的に3頭の遺伝子組換えブタが得られた。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。つぎに、導入した*aP2/FAD2* が機能的に発現しているかどうかを調べるため、遺伝子組換えブタの背側脂肪組織を採取し、体外培養により脱分化させて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細胞内に脂質滴を蓄積させた。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 (18:2n-6) 組成比は、野生型が1.9%であったが、遺伝子組換えブタでは20.3%と約10倍であった⁷⁾。このことは、導入したハウレンソウ由来の*FAD2* が遺伝子組換え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、遺伝子組換え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頭が遺伝子組換え動物であったことから、*aP2/FAD2* 遺伝子がメンデルの法則にしたが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⁷⁾。

以上から、植物由来の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を哺乳動物の体内で機能的に発現させ、オレイン酸 (18:1) をリノール酸 (18:2n-6) へと変換できることを初めて実証した。

しかしながら、これらのような従来の手法で受精卵前核に遺伝子を導入して遺伝子組換えをした大型家畜を作出しようとしても、ウシでは遺伝子の導入効率が0.06%程度と極めて低いこと⁹⁾、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どの欠点がある。さらに、ウシではほとんどがモザイク状の遺伝子組換え個体となることが報告され^{29, 30)}、この技術は実用的なものにならなかった。

一方、体細胞クローン技術を用いてあらかじめ外来遺伝子を導入した培養細胞からクローン個体を生産すれば、得られた個体はすべて遺伝子組換え個体となる。Schniekeら (1997) は、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ておいたヒツジ胎子線維芽細胞を用いて、遺伝子組換えクローンヒツジ (ポリリー) の作出に成功した³¹⁾。この報告によると、受精卵前核への遺伝子顕微注入法に比べ、2.5倍の効率で遺伝子組換え動物が作製できることが示された。1998年には、ウシ¹⁰⁾ およびヤギ³²⁾ でこの体細胞クローン技術を用いた遺伝子組換え動物の作出が報告されている。以来、核移植による遺伝子組換え動物作出技術でさまざまな遺伝子組換え動物が作

出され、その活用範囲は医薬品から食品に渡る^{10, 33, 34)}。

このような遺伝子工学技術を用い、動物体内にn-3PUFAを増加させる試みとして、線虫由来の ω 3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*fat-1*) を導入したマウス、ブタが作出され、これらのマウスやブタでn-3PUFAの増加が確認されている^{8, 35, 36)}。しかしながら、Kaoらの研究では作出された4匹の遺伝子組換えマウスのうち、脂肪酸組成が改変する表現型が確認されたのは1匹だけであった³⁵⁾。また、Kangらの遺伝子組換えマウスやLaiらの遺伝子組換えブタにおいては、脂肪組織のn-3PUFAの増加は示されていなかった^{8, 36)}。これらの結果は、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子をそのまま家畜に導入しても、目的とする脂肪酸を増加させることは困難であることを示している。

5 n-3PUFAを合成する家畜の作出の試み

つぎに、植物由来の α -リノレン酸 (18:3n-3) を合成する酵素である ω 3脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子 (*FAD3*) を利用して、n-3PUFAを新規に合成できる家畜の作出を目指して行ったわれわれの最近の研究を紹介する。

Fig. 1に脂肪酸合成経路を示した。哺乳動物は鎖長延長酵素、 Δ 5、 Δ 6および Δ 9脂肪酸不飽和化酵素を有するので、飽和脂肪酸、オレイン酸 (18:1n-9)、18:2n-9や20:3n-9などのn-9系不飽和脂肪酸を合成することができる。しかしながら、哺乳動物は Δ 12脂肪酸不飽和化酵素および ω 3脂肪酸不飽和化酵素を欠いているため、リノール酸 (18:2n-6) および α -リノレン酸 (18:3n-3) を自身で生合成することができない。一方、プランクトンや植物、またナメクジなどの下等動物には、 Δ 12脂肪酸不飽和化酵素および ω 3脂肪酸不飽和化酵素活性がある。また、これら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種類があることが知られている³⁷⁾。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、アシルキャリアタンパク質 (ACP) と結合した脂肪酸を基質としており、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 b5 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を構成する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 b5 あるいはフェ

Fig. 1 The Pathway of Synthesis, Chain Elongation and Desaturation of Fatty Acids.

Fig. 2 Transfection of *hFAD3* Gene into Bovine Muscle Satellite Cells and Screening of Stably Transfected Cell Lines.

(A) Construction of *pCAG/hFAD3/IRES/EGFP/SV40(neo-r)* for transfection of bovine muscle satellite cells. A 7.7-kb vector contained a 1.73-kb CAG promoter fused to a 1.2-kb *hFAD3* gene, IRES sequence and EGFP gene.

(B, C) Percentage of EGFP-positive cells in each cell lines after 1 passage and 4 passages of cell culture. The ratio of EGFP-positive cells was calculated by counting EGFP-positive cells under UV light in about 100 cells selected at random under normal light. A, B, C, D and E; transfected cell lines.

レドキシンを利用する2種類が知られている。これら3種類の酵素は、基質特異性が極めて高く、不飽和結合を導入する位置も極めて特異的であることが知られている³⁷⁾。また、acyl-CoA 不飽和化酵素には、 $\Delta 9$ 位以降に不飽和結合を導入する酵素は存在しない。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、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に結合する acyl-lipid 不飽和化酵素を利用することを考えた。 $\Delta 12$ および $\omega 3$ 脂肪酸不飽和化酵素は、acyl-lipid 不飽和化酵素であり、 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素としては FAD6 および FAD2、 $\omega 3$ 脂肪酸不飽和化酵素は FAD7 および FAD3 がある。これらのうち FAD6 と FAD7 は葉緑体膜に結合する酵素で、FAD2 と FAD3 が小胞体膜結合型の酵素である。われわれは、すでに FAD2 の *FAD2* 遺伝子を導入したブタにおける *FAD2* 遺伝子の機能的発現を実証している⁷⁾。以上のことから、*FAD3* 遺伝子を動物細胞に導入すれば、哺乳動物細胞でも *FAD3* 遺伝子が機能し、 α -リノレン酸 (18:3n-3) を新規に生合成できるのではないかと考えた。アマは陸生植物で α -リノレン酸 (18:3n-3) をもっとも多く含有している。このため、私たちは *FAD3* 遺伝子を、アマの幼若種子から単離した。植物と動物では遺伝子のコドン使用頻度が異なるため、ホストの哺乳動物と異なる植物などの遺伝子を哺乳動物に導入すると、導入した遺伝子が、しばしば十分に発現しないことが知られている。この不都合を解決するため、利用したい他生物の遺伝子のコドン使用頻度を、ヒトのコドン使用頻度に合わせる塩基配列の最適化がされている。リポーター遺伝子でしばしば利用される緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子は、オワンクラゲ由来の *GFP* 遺伝子のコドン使用頻度を哺乳動物細胞型に最適化したものである³⁸⁾。また、線虫のグルタミン酸作動性クロライドチャネル遺伝子のコドン使用頻度を最適化した結果、哺乳動物細胞において膜タンパク質の発現の増加が認められたこと³⁹⁾、さらに線虫の *fat-1* 遺伝子のコドン使用頻度をヒトの使用頻度に近づけた *hfat-1* 遺伝子を用いた遺伝子改変マウスやブタにおいて n-3 系脂肪酸含量が増加したことが示されている^{8, 36)}。したがって、ここでもアマ由来の *FAD3* を哺乳動物で高発現させるため、塩基配列の最適化を行い、最適化遺伝子 (*humanized FAD3*; *hFAD3*) を作製した。この *hFAD3* を全身で恒常的に強発現させるため、CAG プロモーターの下流に連結させ、さらに導入遺伝子の細胞株を視覚的に選択するために、IRES 配列と EGFP 遺伝子を連結した。また、遺伝子導入細胞の第一段階選択のためネオマイシン耐性カセット

を組み込んだ哺乳動物細胞発現ベクターを構築した (*pCAG/hFAD3/IRES/EGFP(neo^r)*, Fig. 2A)。次に、このベクターを哺乳動物脂肪細胞へ導入した。

導入する哺乳動物細胞としては、ウシ筋衛星細胞を用いた。筋衛星細胞は骨格筋内に存在し通常休止状態であるが、骨格筋に損傷が生じた場合の筋の再生や、筋肥大に中心的な役割を担っている⁴⁰⁾。また、この細胞は筋肉のほかに、骨、軟骨、心筋、脂肪細胞へ分化することが示されている⁴¹⁾。さらに、筋衛星細胞は周囲の環境により脂肪細胞や骨細胞へも分化できる能力を有する一種の間葉系幹細胞であることが最近明らかになりつつある。この筋衛星細胞へ *hFAD3* 遺伝子を導入し、脂肪細胞へ分化させれば、*hFAD3* 遺伝子の脂肪細胞での発現と脂肪酸組成への影響を検討できると考えた。まず、遺伝子導入試薬を用いて筋衛星細胞へ *hFAD3* 遺伝子を導入し、G418 で選択培養した。つぎに、得られた細胞コロニーのうち EGFP 蛍光が確認できるコロニーのみをさらに選択し、導入遺伝子が発現している細胞株を単離した。これら細胞コロニーは、4 回以上継代を行い、その都度蛍光の観察を行った。その結果、5 株の細胞株 (A,

Fig. 3 Accumulation of Lipid in Transfected Bovine Muscle Satellite Cells by Induction of Differentiation into Lipogenic Adipocytes.

(A) Triacylglycerol contents in lipogenic adipocytes transfected with *hFAD3*. After Oil Red-O staining, pixels of stained areas were counted using NIH image software.

(B) Oil Red-O staining of transfected adipocytes. Control: non-transfected cells, B, C and D: the transfected cell lines. Means with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$. Error bars represent SEM.

Table 1 Fatty Acid Composition of Total Lipid of Satellite Cells Carrying an *hFAD3* Gene before Induction of Differentiation (g/100 g of total fatty acids).

Fatty acid	Control	Transfected cell lines ^a	
		C	D
12:0	0.63±0.09	0.43±0.17	0.40±0.06
14:0	2.30±0.27	1.90±0.10	1.80±0.27
15:0	0.53±0.03	0.50±0.06	0.47±0.07
16:0	18.07±0.48	17.87±0.30	19.73±1.23
16:1	1.80±0.47	0.93±0.03	1.13±0.09
17:0	2.40±0.37	1.07±0.03	0.83±0.15
17:1	0.47±0.17	0.30±0.00*	0.37±0.03*
18:0	9.87±0.29	11.80±1.52	10.93±0.15
18:1	18.03±0.97	15.70±0.47	20.03±3.05
18:2 (n-6)	7.23±0.58	7.53±0.52	9.47±1.01
18:3 (n-3)	0.90±0.15	0.00±0.00*	0.17±0.17*
20:0	0.30±0.00	0.00±0.00*	0.00±0.00*
20:1	0.63±0.37	0.13±0.13	0.10±0.10
20:2 (n-6)	0.40±0.00	0.27±0.13	0.53±0.09
20:3 (n-6)	1.07±0.03	1.33±0.18	1.50±0.15
20:4 (n-6)	4.57±0.03	6.10±0.76	6.20±0.61
20:5 (n-3)	1.00±0.20	0.47±0.47	0.10±0.10*
22:0	0.43±0.13	0.00±0.00*	0.00±0.00*
22:1	0.60±0.30	0.00±0.00*	0.00±0.00*
22:4 (n-6)	1.10±0.00	3.23±0.79*	2.27±0.56
22:5 (n-3)	2.57±0.07	2.93±0.27	3.10±0.31
22:6 (n-3)	3.57±0.22	4.97±0.13	6.40±1.17*
24:1	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Unknown	23.00±1.97	26.40±2.06	18.30±3.07
Sum of n-6 FA	14.37±0.62	18.47±2.22	18.97±1.78
Sum of n-3 FA	6.57±0.48	5.83±0.24	5.93±0.35
n-6/n-3	2.20±0.08	3.21±0.49	3.37±0.19*

Lipids were analyzed in three independent samples from each batch of cells. Results are means ± SEM. ^aControl: Non-transfected muscle satellite cells, C and D: transfected satellite cell lines.

*Significantly different ($P < 0.05$) between control and transfected cell lines.

B, C, D および E) を得た (Fig. 2B, 2C)。そのうち、細胞株 E は継代を重ねると EGFP 蛍光が確認できなくなったことから、*hFAD3* 遺伝子が染色体に安定的に組み込まれていないと考えた。また、細胞株 A は 4 回継代後も蛍光を示す細胞の割合は 85.9% と高率であったが、蛍光強度が他の株と比べて低かった。このことから、細胞株 A は *hFAD3* 遺伝子の発現量が低いと考えられた。以上から、安定的に染色体に組み込まれ、*hFAD3* 遺伝子の発現量が高い細胞株 B, C および D を得

Table 2 Fatty Acid Composition of Total Lipid of Lipogenic Adipocytes Carrying an *hFAD3* Gene (g/100 g of total fatty acids).

Fatty acid	Control	Transfected cell lines ^a	
		C	D
12:0	0.47±0.12	0.20±0.00	0.27±0.12
14:0	1.47±0.03	1.13±0.33	1.47±0.09
15:0	0.33±0.33	0.30±0.00	0.47±0.03
16:0	13.60±0.95	17.60±0.90*	15.20±1.13
16:1	1.03±0.09	0.97±0.03	0.90±0.10
17:0	1.40±0.45	0.77±0.07	0.93±0.07
17:1	0.20±0.10	0.27±0.33	0.30±0.00
18:0	8.40±0.90	11.30±0.15*	10.60±0.86*
18:1	15.13±1.29	18.27±1.34	14.90±1.67
18:2 (n-6)	12.40±0.12	9.37±0.27*	9.40±0.38*
18:3 (n-3)	0.03±0.03	0.30±0.00*	0.27±0.03*
20:0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
20:1	0.23±0.07	0.20±0.00	0.27±0.03
20:2 (n-6)	0.77±0.07	0.93±0.03	0.83±0.09
20:3 (n-6)	1.97±0.07	2.43±0.07*	2.17±0.23
20:4 (n-6)	6.80±0.27	7.53±0.13	6.56±0.52
20:5 (n-3)	1.23±0.03	0.43±0.03*	0.53±0.15*
22:0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
22:1	0.20±0.10	0.00±0.00*	0.27±0.03
22:4 (n-6)	1.97±0.07	3.70±0.27*	0.30±0.17*
22:5 (n-6)	0.00±0.00	0.13±0.07*	0.00±0.00
22:5 (n-3)	4.27±0.17	5.80±0.12*	5.30±0.45*
22:6 (n-3)	3.57±0.22	4.97±0.13	6.40±1.17*
24:1	0.00±0.00	0.00±0.00	0.10±0.10
Unknown	24.53±1.92	13.07±2.17*	22.57±2.94
Sum of n-6 FA	23.90±0.46	24.10±0.25	19.23±1.17*
Sum of n-3 FA	9.10±0.40	11.50±0.27*	12.50±1.29*
n-6/n-3	2.63±0.07	2.10±0.37*	1.57±0.19*

Lipids were analyzed in three independent samples from each batch of cells. Results are means ± SEM. ^aControl: Non-transfected adipocytes, C and D: transfected adipocytes.

*Significantly different ($P < 0.05$) between control and transfected adipocytes.

た。これら細胞株 B, C および D を脂肪細胞に分化誘導し、得られた脂肪細胞の脂質蓄積量を Oil Red O 染色により定量した。その結果、3 株の細胞株は対照区と同等の蓄積量を示した ($P < 0.05$)。このことから、得られた細胞株は遺伝子導入後であっても脂肪細胞分化能を維持していることが示された (Fig. 3)。次に、細胞の染色体数を調べたところ、細胞株 C および D が非遺伝子導入細胞の正常細胞の割合と同等であったが、細胞株 B は正常な染色体数の細胞は少なかった ($P < 0.05$)。その

Fig. 4 Partial Gas Chromatograms Showing the Polyunsaturated Fatty Acid Profiles of Total Lipid Extracted from *hFAD3* Adipocytes. Control: Non-transfected adipocytes, C and D: Transfected adipocytes.

ため、以降の研究には細胞株 C および D を用いた。次に、これら細胞株 C および D の脂肪酸組成を解析した。脂肪細胞へ分化させる前の *hFAD3* 遺伝子導入筋衛星細胞では、非遺伝子導入細胞と比べても、 α -リノレン酸 (18:3n-3) および n-3 系脂肪酸の増加は認められなかった ($P > 0.05$, Table 1)。一方、脂肪細胞へ分化させ、脂質を蓄積した遺伝子導入脂肪細胞では α -リノレン酸 (18:3n-3) および n-3 系脂肪酸が有意に増加していた ($P < 0.05$, Table 2, Fig. 4)。また、FAD3 の基質であるリノール酸 (18:2n-6) や n-6 系脂肪酸が減少し、そのため n-6/n-3 比も減少した ($P < 0.05$, Table 2, Fig. 4)。*hFAD3* 発現ベクターは *hFAD3* 遺伝子の下流に IRES および *EGFP* 遺伝子を連結させているので、EGFP 蛍光を定量することで *hFAD3* 遺伝子の発現量を推定することができる⁴²⁾。Fig. 5 に示すように、分化誘導後の *hFAD3* 遺伝子導入脂肪細胞は分化誘導前と比べて EGFP 発現量が高かった。筋衛星細胞は分化誘導を行うことで細胞の分裂、増殖を停止させ、脂質を蓄積する。したがって、分化誘導により、*hFAD3* 遺伝子導入細胞は脂肪細胞に分化し、脂質を蓄積するとともに EGFP タ

Fig. 5 EGFP Expression in Transfected Lipogenic Adipocytes Carrying *pCAG/hFAD3/IRES/EGFP/SV40(neor)*. (A) Photomicrographs showing transgene expression in transfected satellite cells and control non-transfected satellite cells. Satellite cells were non-differentiated muscle satellite cells (Upper). Differentiated adipocytes were transfected satellite cells that accumulates lipid by differentiation inducement (Lower). (B) Fluorescence intensity of EGFP in transfected cell lines. C and D were transfected satellite cell lines. -: Muscle satellite cells before induction of differentiation. +: Transfected satellite cells that accumulates lipid by differentiation inducement. Control: non-transfected cells, B, C and D: the transfected cell lines. Means with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$. Error bars represent SEM.

ンパク質も蓄積したと思われる。このように EGFP タンパク質が蓄積している細胞は FAD3 酵素タンパク質もより多く蓄積していると考えられ、その結果 Table 2 に示すように、*hFAD3* 遺伝子導入細胞で n-3 系脂肪酸含量が多くなったと考えられた。一方で、分化誘導前の細胞では、細胞が分裂・増殖しているため、FAD3 酵素タンパク質や EGFP タンパク質が分裂後の娘細胞に分配・希釈されることで細胞内には蓄積しない。そのため、FAD3 量が少なく、その結果 n-3PUFA が増加しなかったと考えられる。また、Fig. 5B で示したように、C と比較して D はより遺伝子の発現量が高いことから、分

Table 3 Development of Bovine Embryos Cloned from Cell Lines.

Donor cell	No. of cloned embryos	No. (%) of cleaved embryos	No. (%) of blastocysts
Control ^a	285	213 (75±3)	75 (27±5)
Line C ^b	169	114 (73±6)	30 (17±3)
Line D ^c	149	111 (73±6)	26 (21±5)

^aControl: Non-transfected muscle satellite cells, The results represent the average of eight independent experiments. ^{b,c}Lines C and D: Transfected satellite cell lines, The results represent the average of four independent experiments.

化誘導後の脂肪酸組成解析において、低発現の細胞株に比べて高発現の細胞株で *n*-3PUFA が明らかに高かった ($P < 0.05$)。これらのことから、*hFAD3* は哺乳動物の脂肪細胞において機能的に発現し、脂肪酸組成を改変し、*n*-3PUFA を増加させることが示された。本研究での *n*-3PUFA の組成は、乳牛の飼料にアマ種子および魚油を添加した場合と類似していることから²⁴⁾、細胞内で新規合成された α -リノレン酸 (18:3*n*-3) は食餌で摂取された α -リノレン酸 (18:3*n*-3) と同様に炭素鎖が延長し、ドコサペンタエン酸 (DPA: 22:5*n*-3) や DHA (22:6*n*-3) などが生成される代謝経路をたどると推測された。

さらに、*hFAD3* 遺伝子の機能的発現が確認された細胞株 C および D を用いてクローン胚の作製を行った。その結果、作製したクローン胚の卵割率、胚盤胞への発生率は対照区の非遺伝子導入細胞によるクローン胚と比較してやや低かったものの有意差は認められなかった ($P > 0.05$, Table 3)。また、これら発生した遺伝子導入クローン胚の EGFP 蛍光の観察および RT-PCR による *hFAD3* の発現を調べたところ、すべての胚で EGFP 蛍光が認められ、RT-PCR でも胚内での *hFAD3* の発現が認められた (Fig. 6)。このことから、細胞レベルでの機能的発現を検討した *hFAD3* 導入筋衛星細胞を用いて作製したクローン胚が非遺伝子導入細胞と同等に発生することが示された。

これらの研究の結果から、*hFAD3* 遺伝子を導入し *n*-3PUFA 含量を増加させたウシ個体を作出できると考えている。

なお、これら *hFAD3* 遺伝子を導入したウシ筋衛星細胞に関する研究に関する詳細は、われわれの報告⁴³⁾ を参考にされたい。

6 人の健康に良い家畜の作出に向けて

hFAD3 遺伝子を筋衛星細胞に導入し、得られた遺伝子導入細胞のうち機能的発現が確認できた細胞を用い

Fig. 6 Transgene Expression in Blastocysts Cloned from Cell Lines.

(A) Photomicrographs showing EGFP expression in blastocysts cloned from transfected satellite cell lines. Control: Blastocysts cloned from non-transfected muscle satellite cells at 168hpf. Lines C and D: Blastocysts cloned from transfected satellite cell lines C and D at 168hpf.

(B) mRNA expression of *hFAD3* in the clone embryos by RT-PCR.

Amplification of the *hFAD3* transgene in the cloned blastocysts at 168hpf. As a control, GAPDH gene was used for analysis by RT-PCR.

て、クローン胚を作出することに成功した。われわれの研究室では、すでに体細胞クローン技術を用いて *EGFP* 遺伝子とホタルルシフェラーゼ遺伝子を同時に構成的に発現する遺伝子組換えウシを作出している (http://www.kinrenju.jp/housyou/H20_B5.pdf)。今後は、*hFAD3* 遺伝子導入クローン胚を受胎雌に移植し *hFAD3* 遺伝子組換えウシの作出と脂肪組織や乳など個体での *n*-3PUFA 量の検討を考えている。

n-3PUFA は疫学的調査から、その有効性が注目されている。しかしながら、疾患の改善には、摂取する脂質の内 5～10%が必要である²⁵⁾。このことから、遺伝子組換え動物を作出しても、その発現効率を高める検討が必要となるだろう。

文 献

- 1) JAMA, 269, 3015-23 (1993).
- 2) J. Dyerberg, H.O. Bang, & J. Scand, *Clin. Lab. Invest.*, 42, 7-13 (1982).
- 3) J.E. Kinsella, B. Lokesh & R.A. Stone, *Am. J. Clin. Nutr.*, 52, 1-28 (1990).

- 4) W.E. Connor, *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**, 171-5 (2000).
- 5) P.C. Calder, *Am. J. Clin. Nutr.*, **83**, 1505-19 (2006).
- 6) J. Wood & M. Enser, *Br. J. Nutr.*, **78 Suppl 1**, 49-60 (1997).
- 7) K. Saeki, K. Matsumoto, M. Kinoshita, I. Suzuki, Y. Tasaka, K. Kano, Y. Taguchi, K. Mikami, M. Hirabayashi, N. Kashiwazaki, Y. Hosoi, N. Murata & A. Iritani, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6361-6 (2004).
- 8) J.X. Kang, J. Wang, L. Wu & Z.B. Kang, *Nature*, **427**, 504 (2004).
- 9) W.H. Eyestone, *Theriogenol.*, **51**, 509-17 (1999).
- 10) J.B. Cibelli, S.L. Stice, P.J. Golueke, J.J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell, F.A. Ponce de Leon & J.M. Rob, *Science*, **280**, 1256-8 (1998).
- 11) G. Biorck, *Cardiovascular Epidemiology* (Key and White, eds), Hoeber-Harper, p.10, (1956).
- 12) 平井愛山, 日内会誌, **74**, 13-20 (1985).
- 13) S. Kobayashi, T. Hamazaki, A. Hirai, T. Terano, Y. Tamura, Y. Kanakubo, S. Yoshida, T. Fujita & A. Kumagai, *Clin. Haemorrhol.*, **5**, 493 (1985).
- 14) M. Omoto, T. Sawamura & H. Hara, 日衛誌, **38**, 887 (1984).
- 15) 熊谷 朗, EPA の医学・疫学・栄養学から臨床応用まで, 中山書店, pp.9-32 (1994).
- 16) D.H. モーリス, アマニ—その健康と栄養に関する小冊子—第三版, pp.50-52 (2003).
- 17) D.M. Nash, R.M.G. Hamilton, K.A. Sanford & H.W. Hulan, *Can. J. Animal Sci.*, **76**, 377-83 (1996).
- 18) L. Caston & S. Leeson, *Poultry Sci.*, **69**, 1617-20 (1990).
- 19) A.O. Ajuyah, D.U. Ahn, R.T. Hardin & J.S. Sim, *J. Food Sci.*, **61**, 43-6 (1993).
- 20) M. Massaer, P. Mazzu, M. Haumont, M. Magi, V. Daminet, A. Bollen & A. Jacquet, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **125**, 32-43 (2001).
- 21) J.J. Kennelly, *Conference and Annual Meeting*, Flax Council of Canada, Winnipeg, MB (1993).
- 22) I.W. McDonald & T.W. Scott, *World Rev. Nutr. Diet.*, **26**, 114-207 (1977).
- 23) G.R. Khorasani & J.J. Kennelly, *Proc. Flax Inst.*, **55**, 127-34 (1994).
- 24) N.D. Scollan, N.J. Choi, E. Kurt, A.V. Fisher, M. Enser & J.D. Wood, *Br. J. Nutr.*, **85**, 115-24 (2001).
- 25) M. Hirose, A. Masuda, N. Ito, K. Kamano & H. Okuyama, *Carcinogenesis*, **11**, 731-5 (1990).
- 26) J.W. Gordon, G.A. Scangos, D.J. Plotkin, J.A. Barbosa & F.H. Ruddle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7380-4 (1980).
- 27) R.J. Wall, D.E. Kerr & K.R. Bondioli, *J. Dairy Sci.*, **80**, 2213-24 (1997).
- 28) V.G. Puresl, D.J. Bolt, M.F. Miller, C.A. Pinkert, R.E. Hammer, R.D. Palmiter & R.L. Brinster, *J. Reprod. Fertil.*, **40**, 235-45 (1990).
- 29) P.A. Krimpenfort, A. Rademaker, W. Eyestone, A. Van der Schans, S. Ven den Broek, P. Koolman, E. Kootwijk, G. Peiper, R. Stijker & H. De Boer, *Bio. Technol.*, **9**, 844-7 (1991).
- 30) W.H. Eyestone, *Theriogenol.*, **51**, 509-17 (1999).
- 31) A.E. Schieke, A.J. Kind, W.A. Ritchie, K. Mycock, A.R. Scott, M. Ritchie, I. Wilmut, A. Colman & K.H. Campbell, *Science*, **278**, 2130-3 (1997).
- 32) A. Baguisi, E. Behboodi, D.T. Melican, J.S. Pollock, M.M. Destrempe, C. Cammuso, J.L. Williams, S.D. Nims, C.A. Porter, P. Midura, M.J. Palacios, S.L. Ayres, R.S. Denniston, M.L. Hayes, C.A. Ziomek, H.M. Meade, R.A. Godke, W.G. Gavin, E.W. Overstrom & Y. Echelard, *Nat. Biotechnol.*, **17**, 456-61 (1999).
- 33) Y. Kuroiwa, P. Kasinathan, H. Matsushita, J. Sathiyaseelan, E.J. Sullivan, M. Kakitani, K. Tomizuka, I. Ishida & J.M. Robl, *Nat. Genet.*, **36**, 775-80 (2004).
- 34) R.J. Wall, A.M. Powell, M.J. Paape, D.E. Kerr, D.D. Bannerman, V.G. Pursel, K.D. Wells, N. Talbot, & H.W. Hawk, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 445-51 (2005).
- 35) B.T. Kao, K.A. Lewis, E.J. DePeters & A.L. Van Eenennaam, *J. Dairy Sci.*, **89**, 3195-201 (2006).
- 36) L. Lai, J.X. Kang, R. Li, J. Wang, W.T. Witt, H.Y. Yong, Y. Hao, D.M. Wax, C.N. Murphy, A. Rieke, M. Samuel, M.L. Liville, S.W. Korte, R.W. Evans, T.E. Starzl, R.S. Prather & Y. Dai, *Nat. Biotechnol.*, **24**, 435-6 (2006).
- 37) D.A. Los & N. Murata, *Biochim. Biophys. Acta*, **1394**, 3-15 (1998).
- 38) J. Haas, E.C. Park & B. Seed, *Curr. Biol.*, **6**, 315-24 (1996).
- 39) E.M. Slimko & H.A. Lester, *J. Neurosci. Methods*, **124**, 75-81 (2003).
- 40) P. Skeale & M.A. Rudnicki, *Develop. Biol.*, **218**, 115-24 (2000).
- 41) A. Asakura, M. Komaki & M.A. Rudnicki, *Differentiation*, **68**, 245-53 (2001).
- 42) J. Pelletier & N. Sonenberg, *Nature*, **334**, 320-5 (1988).
- 43) Y. Indo, A. Tatemizo, Y. Abe, I. Suzuki, K. Matsumoto, Y. Hosoi, M. Kinoshita, K. Mikami, N. Murata, A. Iritani & K. Saeki, *Biochim. Biophys. Acta*, **1791**, 183-90 (2009).