

論文内容の要旨

氏名	印 藤 頼 子
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	工第21号
学位授与の日付	平成21年3月21日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	植物由来脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を用いたウシの脂肪酸組成改変に関する研究
論文審査委員(主査)	教授 佐 伯 和 弘
	(副主査) 教授 細 井 美 彦
	(副主査) 教授 松 本 和 也

食べ物の旨味の一つである脂質は近年の食文化の欧米化、飽食化によってその摂取量が増加している。それにともない、動物性脂肪を過剰に摂取することが原因といわれている。冠動脈疾患や血栓性疾患の発生率が増加している。疫学調査の結果、動物に多く含まれる飽和脂肪酸を摂取しているヒトたちに比べ、不飽和脂肪酸を多く摂取しているヒトたちは虚血性心疾患による死亡率が低かった。さらに、n-3系脂肪酸の α -リノレン酸(18:3n-3)は抗炎症作用を示すこと、エイコサペンタエン酸(EPA, 20:5n-3)およびドコサヘキサエン酸(DHA, 22:6n-3)は抗血栓性疾患、ガン増殖抑制、および発ガン抑制を示すことが報告されている。このことから、n-3系不飽和脂肪酸を摂取することが推奨されている。しかしながら、n-3系不飽和脂肪酸は一部の植物、および魚や海獣などの海生動物に多く含まれているため、現代の食生活では摂取が難しい。また、旨味として定着した脂質過多の食生活を変えることは非常に困難である。

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)を合成する酵素をもたないため、体内で合成することができない。そのため、食餌で摂取しなければならない。これら脂肪酸を合成する酵素はそれぞれ Δ 12脂肪酸不飽和酵素、および ω 3脂肪酸不飽和酵素であり、高等植物、ラン藻、および線虫が有している。我々の研究室では、植物由来 Δ 12脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子(FAD2)をブタに導入することで、植物の遺伝子が動物の体内で機能的に発現し、哺乳動物は合成できないリノール酸(18:2n-6)を新規合成できることを示した。また、線虫由来の ω 3脂肪酸不飽和化酵素をコードする fat-1 遺伝子が導入された哺乳動物細胞において、 α -リノレン酸(18:3n-3)の増加が認められた。これらのことから、植物由来の ω 3脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子(FAD3)を家畜に導入することで、食習慣を変えることなく生活習慣病を予防し、ヒトの健康に貢献できる家畜が作出できると考えた。

そこで本研究では畜肉の脂肪酸組成を改変し、不飽和脂肪酸を増やすことを目的として、1)陸生植物でもっとも α -リノレン酸(18:3n-3)含量の高いアマから FAD3 cDNA を単離し、2)哺乳動物細胞での発現を増加させるため、FAD3 cDNA のコドン使用頻度を最適化し、3)哺乳動物細胞に導入し、その機能的発現を調べ、4)機能的発現が認められた遺伝子導入細胞を用いて体細胞クローン胚を作製し、その発生率と遺伝子発現について検討した。

第2章では、アマから ω 3脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子 FAD3 の単離し、酵母菌をもちいて酵素活性を調べた。FAD3 アミノ酸配列で特徴的なヒスチジンクラスター配列をもとに、degenerate PCR および RACE 法を用いて単離したところ、2種類の cDNA(FAD3 グループ 1、FAD3 グループ 2)を得た。これらの FAD3 cDNA はどちらも3カ所のヒスチジンクラスターと小胞体リテンシヨングナルを有し、既知の植物の FAD3 遺伝子と高い相同性を示した。これら2種類の FAD3 cDNA を酵母菌に導入し、その酵素活性を調べた。その結果、どちらの形質転換酵母でも α -リノレン酸(18:3n-3)の蓄積(0.3-0.4%)が認められた。これらのことは、アマ由来の FAD3 cDNA

が ω 3 脂肪酸不飽和化酵素活性をもつことを示した。

第3章では、哺乳動物においてアマ由来 *FAD3* cDNA の発現効率をあげるため、アマ由来 *FAD3* cDNA のコドン使用頻度を哺乳動物のコドン使用頻度に最適化した。*FAD2* をブタに導入した研究において、*in vivo* でのリノール酸(18:2n-6)の増加は *in vitro* に比べて低かった。また、第2章でも酵母菌での α -リノレン酸(18:3n-3)の蓄積量は低かったことから、種が大きく異なる遺伝子をそのまま導入し、高発現させることは難しいと考えられた。しかしながら、血栓性疾患の予防には n-3 系不飽和脂肪酸が食餌脂質中の 5-10% を占める必要がある。そのため、発現効率を向上させる方法の一つであるコドン使用頻度の最適化を行ない、ヒトのコドン使用頻度へアマ *FAD3* cDNA 塩基配列を再構築した。PCR 法を用い再構築した結果、1202bp のうち 83 塩基が変更された humanized *FAD3* (*hFAD3*)を得た。

第4章では、第3章で再構築した *hFAD3* をウシ筋衛星細胞に導入し、機能的発現について調べた。筋衛星細胞は筋肉、脂肪細胞、骨、軟骨、心筋へ分化することが示されている。このことから、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細胞であることが明らかになりつつある。食餌から体内に吸収される脂肪酸は、脂肪組織にトリアシルグリセロールの形で蓄積されている。そのため、効率良く n-3 系不飽和脂肪酸を摂取するには家畜の脂肪組織で n-3 系不飽和脂肪酸を増やす必要がある。そこで脂肪細胞への分化能を有するウシ筋衛星細胞に *hFAD3* を導入し、脂肪細胞へ分化させた後脂肪酸組成の変化を調べることで、*hFAD3* の脂肪細胞の蓄積脂質への影響が検討できると考えた。*hFAD3* を CAG プロモーターの下流に連結し、さらに IRES 配列および EGFP を連結させ、哺乳動物発現ベクターとした(*pCAG/hFAD3/IRES/EGFP/SV40 (neo)*)。このベクターを、遺伝子導入試薬を用いてトランスフェクトし、安定的に遺伝子導入している細胞株を3種類得た(細胞株 B、C、および D)。これら細胞株の脂肪細胞への分化能を検討した結果、細胞株 B、C、および D の脂質蓄積量は対照区(非遺伝子導入筋衛星細胞)と同等だった。さらに、染色体検査を行ない細胞の正常性について調べた。その結果、細胞株 C および D は正常な染色体数(60)をもつ細胞の割合が、対照区(非遺伝子導入筋衛星細胞)と同等だった。しかしながら、細胞株 B は染色体数 59 と 1 本欠けた細胞数の割合が多く、正常な染色体数をもつ細胞の割合が低かった。よって、以降の実験は細胞株 C および D を用いた。次に EGFP 蛍光強度を計測することにより、導入遺伝子の発現量を調べた。EGFP は IRES 配列を介して *hFAD3* と連結している。IRES 配列を介することで *hFAD3* と EGFP はそれぞれ単独に翻訳されるが、同一 mRNA 上から翻訳されるため発現量に相関がみられることが知られている。EGFP 蛍光強度を調べたところ、分化誘導前の遺伝子導入筋衛星細胞より、分化誘導後の遺伝子導入脂肪細胞の方が導入遺伝子の発現量が強いことが示された。遺伝子導入筋衛星細胞は分裂

増殖を繰り返すので導入遺伝子産物は蓄積しない。しかしながら、遺伝子導入脂肪細胞は分化したことにより分裂増殖が停止し、導入遺伝子産物が蓄積する。そのため、遺伝子導入筋衛星細胞より発現量が高くなったと考えられた。そこで遺伝子発現量の異なる、分化誘導前の遺伝子導入筋衛星細胞と分化誘導後の遺伝子導入脂肪細胞の脂肪酸組成を調べた。その結果、遺伝子導入筋衛星細胞では α -リノレン酸(18:3n-3)や他の n-3 系脂肪酸の増加は確認できなかった。それに対し、遺伝子導入脂肪細胞では α -リノレン酸(18:3n-3)、DPA(22:5n-3)および DHA(22:6n-3)が増加し n-3 系脂肪酸の総量も増加していた。また、細胞株 D は C より導入遺伝子発現量が高く、脂肪酸組成の変動も細胞株 C より大きかった。このことから、導入遺伝子をより多く発現した細胞で n-3 系脂肪酸が増加することが示された。遺伝子導入脂肪細胞において DPA(22:5n-3)の増加が著しかった。DPA(22:5n-3)はタテゴアザラシや母乳に含まれる脂肪酸で、血栓形成抑制効果が EPA(20:5n-3)よりも強いことで注目されている。しかしながら、DPA(22:5n-3)はウシの肉や乳には殆ど含まれていない。さらに、遺伝子導入脂肪細胞において n-6/n-3 の割合が減少していた。最近の研究で、生長の過程において n-6/n-3 を 1-2:1 することが必要であるとされている。以上から、*hFAD3* は脂肪細胞で機能的に発現して脂肪酸組成を改変し、ヒトの健康に有用である DPA(22:5n-3)の増加や、n-6/n-3 の減少が示された。

第5章では、第4章で得られた遺伝子導入筋衛星細胞をドナー細胞に用いてクローン胚を作製し、その発生率および遺伝子発現について調べた。近年、あらかじめ遺伝子を組換えた培養細胞を利用した体細胞クローンにより、数多くの遺伝子改変動物が作出されている。また、導入遺伝子が高率に発現している細胞をドナー細胞として用いることで、より効率的に遺伝子改変動物が作出できると知られている。そこで、第4章で細胞の正常性および導入遺伝子の機能的な発現が確認された細胞を用いてクローン胚を作製し、その発生率を調べた。その結果、対照区(非遺伝子導入クローン胚)と同等の発生率を示した。また、EGFP 蛍光の観察と RT-PCR 法を用いて導入遺伝子 *hFAD3* の発現を調べた。その結果、胚盤胞期胚まで発生したすべての胚で EGFP 蛍光が確認され、RT-PCR においても *hFAD3* 遺伝子の発現が確認された。このことから、機能的発現の確認された *hFAD3* 遺伝子導入細胞をもちいることでクローン胚を作出できることが示された。

以上の結果から、アマ由来 *hFAD3* 遺伝子はウシ脂肪細胞で機能的に発現し、n-3 系脂肪酸を増加させることが示された。また、機能的発現の確認された *hFAD3* 遺伝子導入細胞を用いてクローン胚を作製することで、*hFAD3* 遺伝子導入ウシの作出の可能性が示された。

論文審査結果の要旨

近年の食文化の欧米化、飽食化によって動物性脂肪を過剰に摂取することが原因といわれている、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。植物や海藻生物に多く含まれる多価不飽和脂肪酸が生活習慣病の予防に有効であることから、すでに植物由来 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子(*FAD2*)をブタに導入することで、植物の遺伝子が動物の体内で機能的に発現し、哺乳動物は合成できないリノール酸(18:2n-6)を新規合成できることが我々の研究で示されている。

印藤氏は、さらにこの植物由来脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を利用して、n-3 系脂肪酸を多く蓄積する家畜が生産できないかと考えた。この n-3 系脂肪酸は抗炎症作用、抗血栓性疾患、ガン増殖抑制を示すことが報告されていることから、n-3 系不飽和脂肪酸を摂取することが推奨されている。しかしながら、n-3 系不飽和脂肪酸は一部の植物、および魚や海生動物に多く含まれているため、現代の食生活では摂取が難しい。具体的には、印藤氏は、畜肉の脂肪酸組成を改変し、不飽和脂肪酸を増やすことを目的として、 ω -3 脂肪酸不飽和化酵素をコードする *FAD3* を単離し、哺乳動物細胞での発現を増加させるため、*FAD3* cDNA のコドン使用頻度を最適化した。さらに *hFAD3* を哺乳動物細胞に導入し、その機能的発現を調べ、その遺伝子導入細胞を用いて体細胞クローン胚を作製し、その発生率と遺伝子発現について検討した。

第 2 章では、まず、植物から *FAD3* 遺伝子の取得を行った。印藤氏は、陸生植物で最も α -リノレン酸含量の多い植物を用いれば、遺伝子の取得が容易になるだろうと考え、アマを用いることを思いついた。またアマのうちでも栽培が容易なベニバナアマを栽培し、その幼弱種子を用いた。なぜなら、アマの種子油の α -リノレン酸含量が非常に高いためである。この種子から ω -3 脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子 *FAD3* の単離、酵母菌をもちいて酵素活性を調べた。その結果、2 種類の cDNA(*FAD3* グループ 1、*FAD3* グループ 2)を得た。これら 2 種類の *FAD3* cDNA の酵母菌への形質転換実験の結果、 ω -3 脂肪酸不飽和化酵素活性をもつことが示された。

この研究で単離されたベニバナアマ由来の *FAD3* 酵素の配列は、NCBI GenBank に登録した (accession # AB457842, #AB457843)。

しかし、この酵母菌での実験では、*FAD3* 酵素活性は、 α -リノレン酸含量が 1% 以下と極めて低く、ヒトの生活習慣病の予防に有効とされる 5-10% にはほど遠いものだった。このため第 3 章では、哺乳動物においてアマ由来 *FAD3* cDNA の発現効率をあげるため、アマ由来 *FAD3* cDNA のコドン使用頻度を哺乳動物のコドン使用頻度に最適化した。PCR 法を用いてアマ *FAD3* cDNA 塩基配列をヒトのコドン使用頻度へ再構築した。その結果、アミノ酸配列を変更することなく哺乳動物で使用頻度の高いコドンに変更することができた。この最適化は、植

物遺伝子では初めてのことで、極めて新規性の高い研究である。

次に、第 4 章では、この最適化した *FAD3* 遺伝子が哺乳類の細胞で機能的に発現するかを調べた。

まず、哺乳類の細胞で発現させるためのベクターを構築した。また、ホストとしてウシ筋星細胞を選択した。この細胞は、筋肉内の幹細胞で、筋肉に障害があると筋肉に分化するが、ある一定の条件下で脂肪細胞にも分化し、和牛に見られる“霜降り”として現れている。*hFAD3* は、CAG プロモーターの下流に連結し、さらに IRES 配列および EGFP を連結させ、哺乳動物発現ベクター(*pCAG/hFAD3/IRES/EGFP/SV40(neo)*)として用いた。このベクターをウシ筋星細胞にトランスフェクトし、安定的に遺伝子導入している細胞株を得た。これら遺伝子導入細胞株は脂肪細胞への分化能を有し、正常性を維持していた。脂肪細胞に分化させた遺伝子導入細胞の脂肪酸組成を調べたところ、 α -リノレン酸(18:3n-3)、DPA(22:5n-3)および DHA(22:6n-3)などの n-3 系脂肪酸が増加していた。また、遺伝子導入脂肪細胞において血栓形成抑制効果の高い DPA(22:5n-3)の増加が著しかった。

ヒト化した植物由来遺伝子を哺乳動物細胞で発現させた報告はこの研究が初である。また、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を哺乳動物の脂肪細胞で機能的に発現させた報告も初であり、新規性が高いといえる。

このように *hFAD3* 遺伝子を導入したウシ細胞に生活習慣病の予防効果の高い DPA(22:5n-3)が多く含まれることから、この遺伝子導入細胞を核ドナーとしてクローンウシを作出すれば、生活習慣病の予防効果の高い牛肉生産に繋がると考えた。そこで、印藤氏は、第 5 章で、*hFAD3* 遺伝子導入筋衛星細胞をドナー細胞に用いてクローン胚を作製し、その発生率および遺伝子発現について調べた。その結果、対照区に非遺伝子導入クローン胚と同等の発生率を示し、胚内で *hFAD3* 遺伝子の発現も確認できた。このことから、機能的発現の確認された *hFAD3* 遺伝子導入細胞をもちいることでクローン胚を作出できることが示された。

以上の結果から、アマ由来 *hFAD3* 遺伝子はウシ脂肪細胞で機能的に発現し、n-3 系脂肪酸を増加させることが示された。また、機能的発現の確認された *hFAD3* 遺伝子導入細胞を用いてクローン胚を作製することで、*hFAD3* 遺伝子導入ウシの作出の可能性が示された。

この研究では、植物由来の脂肪酸不飽和化遺伝子を用いることにより、ウシの脂肪酸組成を改変できる可能性が示された。このことは、家畜改良の遺伝子工学技術において重要な意味を持っていると考えられる。このため、3、4、5章の内容は、近畿大学単独で特許出願した。さらに、インパクトファクターが 3.5 と高い BBA Molecular and Cell Biology of Lipids にアクセプトされた。以上のように、本論文は博士(工学)論文として価値あるものと認める。