

植物由来脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を哺乳動物細胞において高発現させるための コドン使用頻度の最適化

印藤 頼子¹, 鈴木 石根², 松本 和也^{1,3,4}, 細井 美彦^{1,3,4}, 村田 紀夫⁵,
入谷 明^{1,3,4}, 佐伯 和弘^{1,3,4}

要旨

近年、冠動脈疾患や癌などに対する n-3 系脂肪酸の予防効果が知られるようになり、これらの摂取が推奨されている。我々の研究室では、ホウレンソウ由来の $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 *FAD2* をブタに導入することで、植物由来の遺伝子が哺乳動物内で機能的に発現することを実証した。そこで新たに n-3 系脂肪酸の α -リノレン酸を合成する ω -3 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 *FAD3* を家畜に導入し、ヒトの健康に寄与する家畜の作出を考えた。すでにアマから *FAD3* cDNA を単離し酵母菌で酵素活性を確認したが、その発現量は高くなかった。これらの疾患を予防するために必要な α -リノレン酸量は 5-10%とされており、そのため *FAD3* の発現量を高める必要があると考えた。異種間で導入遺伝子発現を上げる方法としてコドン使用頻度の最適化がしばしば利用されている。そこで、本研究でも哺乳動物細胞での発現量を高めるため、アマ由来 *FAD3* cDNA のコドン使用頻度の最適化を試みた。

アマ由来 *FAD3* cDNA とヒトのコドン使用頻度の比較を行い、ヒトのコドン使用頻度に近くなるように塩基配列の変更を行った。それをもとにプライマーを設計し、PCR 法を用いて再構築したところ、設計した配列を得ることができた。その配列は全塩基 1202bp のうち 83bp が変更されていた。

1. 緒論

哺乳動物は $\Delta 12$ および ω -3 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を欠いているため、リノール酸 (18:2n-6) と α -リノレン酸 (18:3n-3) を合成することはできないが、これら脂肪酸は哺乳動物において正常な成長に欠くことのできない必須脂肪酸である^(1,2)。そのうち、 α -リノレン酸 (18:3n-3) やエイコサペンタエン酸 (EPA, 20:5n-3)、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-3 PUFAs) には、抗アトピー性皮膚炎、抗血栓性疾患、抗ガン等の生活習慣病に低減効果があることが報告されている⁽³⁻⁶⁾。しかし、これら n-3 PUFAs は魚、海藻などの海産物や、亜麻仁油や紫蘇油などの植物由来の乾性油に多く含まれ、陸生生物の含量は低率である⁽⁷⁾。そのため、現在の先進国で見られるウシやブタなどの畜肉やパーム油などの植物油に代表される陸生生物由来食品の過剰摂取と、海産生物の摂取不足などの偏った食生活では n-3 PUFAs は摂取されにくい⁽⁸⁾。我々はブタにホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) 根部由来のリノール酸 (18:2n-6) の生成に関わる $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子 *FAD2* (fatty acid desaturation 2) を導入することでブタにおいてリノール酸 (18:2n-6) が新規に合成されることを実証した⁽⁹⁾。そこでさらに ω -3 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 *FAD3* (fatty acid desaturation 3) を家畜に導入して発現させれば、ヒトの健康に寄与できる n-3 PUFAs を多く含む食肉や乳製品を供給できるものと考えた。すでに α -リノレン酸 (18:3n-3) の生成に関わる ω -3 脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子 (fatty acid desaturation 3, *FAD3*) をアマ科の植物

原稿受付 2008 年 6 月 19 日

1. 近畿大学生物理工学専攻生物工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 筑波大学生命環境科学研究科情報生物科学専攻, 〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1
3. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
4. 近畿大学先端技術総合研究所, 〒642-0017 和歌山県海南市赤坂 14-1
5. 基礎生物学研究所, 〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38

ベニバナアマ (*Linum grandiflorum*)の幼弱種子から単離し、遺伝子の哺乳動物細胞への導入および導入遺伝子の細胞内での機能的発現を n-3 PUFAs 量を調べることで検討した。その結果、n-3 PUFAs の増加は認められたもののその量は低かった。n-3 PUFAs の心筋梗塞や血栓性疾患の予防に効果を発揮させるためには、その割合が食餌中脂質の 5-10%必要と言われていた⁽¹⁰⁾。したがって、n-3PUFAs の含量を高めるためには、*FAD3* 遺伝子の発現効率を高めることが極めて重要と考えた。

異種遺伝子の哺乳動物細胞での発現が低量であることの原因として、コドン使用頻度の大きな差によってその遺伝子発現が妨げられていることがあげられている。64 種類のコドンが 20 種類のアミノ酸に対応しているため、必然的に縮重があり、メチオニンやトリプトファンを除いたアミノ酸は 2 から 6 つの同義コドンをもっている。同義コドンは生物種ごとに一樣に使われておらず、特定のコドンに偏りがみられ、この偏りのパターンは生物種が類似であれば類似であること、発現量の多い遺伝子ほど偏りが強い傾向があること、また偏りの大きさと tRNA の量に相関があることが報告されている⁽¹¹⁻¹⁴⁾。これらのことから、異種間で導入遺伝子発現を上げる方法として導入する異種遺伝子のコドン使用頻度を哺乳動物細胞のコドン使用頻度に最適化することが報告されている⁽¹⁵⁻¹⁷⁾。しばしばレポーター遺伝子として用いられるオワンクラゲの緑色蛍光タンパク質 (GFP)もコドン使用頻度をヒトの高頻度コドンに最適化されている⁽¹⁸⁾。そこで、植物遺伝子のコドン使用頻度を最適化することで哺乳動物細胞内での発現効率をあげられるのではないかと考えた。そこで本研究では哺乳動物細胞において植物由来 *FAD3* cDNA を効率に発現させるために、*FAD3* cDNA のコドン使用頻度をヒトで高頻度のコドンに最適化した。

2. 材料と方法

2.1 コドン使用頻度を改変した再構築遺伝子の設計

哺乳動物 (ヒト) のコドン使用頻度とアマ由来脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 *FAD3* のコドン使用頻度を Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)を用いて比較した (表 1)。太字はコドンの縮重のあるアミノ酸においてもっとも高い割合を示し、ヒトおよびアマ由来 *FAD3* の偏りの違いを示した。例えば、アルギニンにおいてヒトでは CGC の使用頻度が高いが、*FAD3* では低く代わりに AGA の頻度が高いことが示される。また、アスパラギンにおいてヒトでは AAU が 78%を占めるが、*FAD3* では 54%とやや低くなっている。これらの偏りの違いを表の *hFAD3* (humanized *FAD3*) に示すように改変した。また、再構築遺伝子の 5'末端と 3'末端にはそれぞれ HindIII と BamHI サイトを、開始コドンにはコザック配列⁽¹⁹⁾を配した。このヒトのコドン使用頻度に近づけた再構築遺伝子を humanized *FAD3* (*hFAD3*)とし塩基配列を設計した。再構築遺伝子は、Sinclair ら⁽²⁰⁾と Kim ら⁽¹⁶⁾の PCR 法に従い作製した。作製方法を図 1 に示した。

2.2 PCR プライマーの設計と作成

設計した *hFAD3* の塩基配列を基に、70-90 ベースずつの PCR プライマーを設計した。それらのプライマーは相互に補足するよう、15-20 ベースをオーバーラップさせ、10 組 20 個の合成オリゴヌクレオチドを作製した (Sigma, Missouri, USA)。それらプライマーの配列を表 2 に示した。

2.3 再構築遺伝子の PCR 法による合成

設計したプライマーを用い、PCR 法で *hFAD3* 遺伝子の合成を行った。

まず、それぞれのプライマーセットにおける PCR の条件検討を行った。400ng のアマ由来 *FAD3* cDNA を鋳型とし、表 2 に示したそれぞれのプライマー No.1 と No.2、No.3 と No.4、No.5 と No.6、No.7 と No.8、No.9 と No.10、No.11 と No.12、No.13 と No.14、No.15 と No.16、No.17 と No.18、および No.19

表1 ヒト、アマ由来 *FAD3* cDNA および humanized *FAD3* のコドン使用頻度

	H.sapiens	<i>FAD3</i>	<i>hFAD3</i>		H.sapiens	<i>FAD3</i>	<i>hFAD3</i>		H.sapiens	<i>FAD3</i>	<i>hFAD3</i>			
Ala	GCU	17	28	17	Gln	CAA	12	17	17	Cys	UGU	32	50	50
	C	53	48	52		G	88	83	83		C	68	50	50
	A	13	17	14	Glu	GAA	25	54	23	Phe	UUU	20	30	22
	G	17	7	17		G	75	46	77		C	80	70	78
Arg	CGU	7	8	8	Gly	GGU	12	4	8	Ser	UCU	13	10	10
	C	37	8	38		C	50	29	50		C	28	29	29
	A	6	0	8		A	14	21	8		A	5	13	13
	G	21	8	23		G	24	46	6		G	9	7	7
	AGA	10	46	8	His	CAU	21	40	20		AGU	10	7	7
	G	18	31	15		C	79	60	80		C	34	35	35
Asn	AAU	22	46	23	Ile	AUU	18	26	26	Thr	ACU	14	21	14
	C	78	54	77		C	77	68	68		C	57	43	58
Asp	GAU	25	52	24		A	5	5	5		A	14	29	14
	C	75	48	76	Lys	AAA	18	39	17	G	15	7	14	
Leu	CUU	5	11	6		G	82	61	83	Tyr	UAU	26	25	25
	C	26	40	25	Pro	CCU	19	39	18		C	74	75	75
	A	3	9	3		C	48	7	53	Val	GUU	7	16	6
	G	58	29	57		A	16	39	14		C	25	44	25
	UUA	2	3	3		G	17	14	15		A	5	6	6
	G	6	9	6					G		64	34	63	

太字は最も頻度の高いコドン使用頻度を示す。

hFAD3: humanized *FAD3* アマ由来 *FAD3* cDNA の最適化後の使用頻度を示す。

表2 *hFAD3* の再構築に用いたプライマー

1:5'- AAGCTT CCACCATGTCCCCTCCAAACTCCATGGGAATGGAAGCTGCTCATCCAACCGCCGCCAGCAACGGCGTTCGACG-3'
2:5'-TCTTGAACGGGGGAGCCTCGCTGGGGTTCGAAATCGGGTTTCGCGGCCGGCGCCGTTTCGTCACGTCGACGCCGTTGCT-3'
3:5'-AGGCTCCCCCGTTCAAGATCGCCGACATCCGCGCCGCCATCCCTCCGCACTGCTGGGTGAAGAATCCCTGGCGGAGCC-3'
4:5'-AGCTTGAGTGCCACGGCGGCGAATGCCAGAATGACCACGGCGTCCCGAAGCACGTAGCTGAGGCTCCGCCAGGGATTTC-3'
5:5'-CCGTGGCACTCAAGCTGGACCTCTGGGCTCTGTGGCCGCTCTACTGGGTCGCGCAGGGGACCATGTTTTGGGCTGT-3'
6:5'-TGTTTCAGCCAATAGCTGTCCGAGAAGCTACCATGGCCACAGTCGTGGCCGAGAACGAAGACAGCCAAAACATGGT-3'
7:5'-AGCTATTGGCTGAACAACGTGGTTGGCCATGTCCTGCACTCTGCAATCCTGGTGCCTTACCACGGATGGCGCATCA-3'
8:5'-GCGGCACCCATGACTCATCTTTCTCCACATTGCCGTGATTCTGGTGGTGGGTCTTGTGGCTGATGCGCCATCCGTGGT-3'
9:5'-TGAGTCATGGGTGCCGCTGCCTGAGAAGGTGTACAAGAACCTGGACACAAGCACCAAGTTCATGCGGTTCACTATCC-3'
10:5'-GGGAACCTTTCTTGCCTGGGCTTCGCCTCCACAAGTAGATGGGATACGCAAACATGGGGAGGGGGATAGTGAACCGCATG-3'
11:5'-CCCAGGCAAGAAAGGTTCCCATTTCAACCCCTACAGTGACCTGTTTCGCCCCCAGGAGAGGAAATCAGTCTTAGT-3'
12:5'-GAAGGAGGCGTAGAGCAGGATTAGGGCCATGGAGATCCAAGAGATGGTGGACACTAAGACTGATTCCTCT-3'
13:5'-CTGCTCTACGCCTCCTTCCTGTTTGGTTTCTGACTGTGTTCAAGGTGTATGGCGTCCCCTACCTGATATTTGTGGCGT-3'
14:5'-GTACCAGGGCAGCTTCTCCTCGTGCCCGTGGTGGTGCAGGTACGTCACCATGTCCAGCCACGCCACAAATATCAGGT-3'
15:5'-AAGCTGCCCTGGTACCGCGGGAAGGAGTGGAGCTACCTGCGTGGAGGCCTGACCACCGTAGATAGAGACTACGGCA-3'
16:5'-GATTTGGGGGAAGAGGTGGTGAATCACGTGGGTGCCGATGTCGTGGTGGATGTTGTTGATAATGCCGTAGTCTCTATC-3'
17:5'-ACCTCTTCCCCAAATCCCCACTACCATCTCGTAGAGGGCGACAAAGGAAGCCAAGTCGGTGTGGGGAAGTAC-3'
18:5'-TTGTCGAACAGGTGGAAGGGGAAAGGCCCTGACTTCTTGGGCTCGCGGTAGTACTTCCCCAGCACCGACT-3'
19:5'-CCCTTCCACCTGTTTCGACAACCTGGTGCAGCCTTGGCGAAGACCACTATGTGAGTGACGCAGGGGATGTCGTGTTCT-3'
20:5'- GGATCC TTATCAGGCAGACTTGGACTTGGACTTGGAAAACCTGGAAGATATCTGGGTCTGACTGATAGAACACGACATCCCCCT-3'

太字で示したのはクローニングのときに用いるための制限酵素サイトである

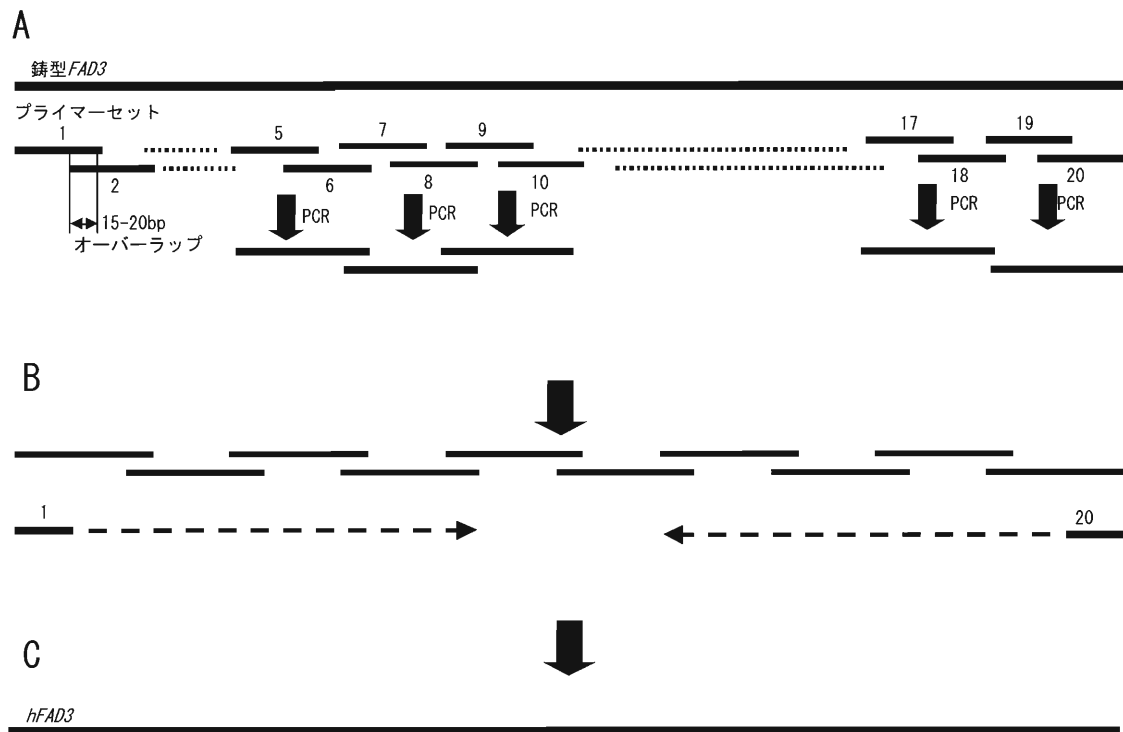


図1 *hFAD3* 再構築の方法

- A: *FAD3*配列を鋳型としてそれぞれのプライマーの組合わせでPCR反応を行った。
 B: ファーストPCR産物全てを鋳型とし5'末端側のプライマーNo.1と3'末端側プライマーNo.20でPCR反応を行った。
 C: 増幅された産物の配列を確認し、*hFAD3*とした。

と No.20 の組み合わせの各 10 サンプルに、4 μ l 10 \times ExTaq Buffer、3.2 μ l dNTP mix、0.2 μ l Taq polymerase (TaKaRa Ex Taq, TaKaRa, Shiga, Japan)、0.5pmol/ μ l primer をそれぞれ加え、全量 40 μ l の反応液を作製した。それを 10 μ l ずつ 4 本の PCR チューブに分注し、それぞれのアニーリング温度を 55 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ Cおよび 63 $^{\circ}$ Cに設定し、94 $^{\circ}$ Cで 10 分間反応させた後、94 $^{\circ}$ Cで 30 秒、各アニーリング温度で 30 秒、72 $^{\circ}$ Cで 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。PCR 反応後、PCR 産物を 4% agar/TAE を用い 1 \times TAE 中で 25 分間泳動した。泳動後、エチジウムブロマイド (EtBr) で染色し、UV トランスイルミネーターで DNA の泳動パターンを観察した。泳動パターンにおいて、約 100bp の位置により明確なバンドを示したサンプルでのアニーリング温度を最適条件とした。作製のために組み合わせた各プライマーの最適アニーリング温度は表 3 に示した。

次に 100ng のアマ由来 *FAD3* cDNA を鋳型とし、1 μ l 10 \times ExTaq Buffer、0.8 μ l dNTP mix、0.05 μ l Taq polymerase、0.5pmol/ μ l primer に全量 10 μ l になるよう滅菌水で調整した反応液を作製した。これを 94 $^{\circ}$ Cで 10 分間反応させた後、94 $^{\circ}$ Cで 30 秒、各最適のアニーリング温度で 30 秒、72 $^{\circ}$ Cで 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。PCR 反応後のそれぞれの産物 3.5 μ l ずつを新しい PCR チューブに回収し、そこへ 5 μ l 10 \times ExTaq Buffer、4.0 μ l dNTP mix、0.25 μ l Taq polymerase、2.5 μ l の No.1 と No.20 のプライマー (表 2) を加え全量 50 μ l の反応液を調整した。94 $^{\circ}$ Cで 10 分間反応させた後、94 $^{\circ}$ Cで 30 秒、58 $^{\circ}$ Cで 30 秒、72 $^{\circ}$ Cで 1 分を 1 サイクルとして、35 サイクル反応させた。PCR 反応後、PCR 産物の電気泳動を行い、1.2kb の位置のバンドを確認した。

表3 *hFAD3* の再構築のためのアニーリング温度

プライマーの組み合わせ	アニーリング温度
1 and 2	60°C
3 and 4	63°C
5 and 6	60°C
7 and 8	55°C
9 and 10	55°C
11 and 12	63°C
13 and 14	63°C
15 and 16	58°C
17 and 18	63°C
19 and 20	58°C
1 and 20	58°C

2.4 PCR産物のサブクローニング

目的とした1.2kbのバンドをDNA抽出キット (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE ヘルスケアバイオサイエンス株式会社, Tokyo, Japan)を用いて回収した。エタノール沈殿を行い、5 µl TE に懸濁した。

回収したPCR増幅断片をDNA ligation Kit Ver2 (TaKaRa, Shiga, Japan)を用いて pGEM-T EASY ベクター (Promega, Wisconsin, USA)へ TA クローニングした。クローニング産物を E.coli JM109 competent cell (TaKaRa, Shiga, Japan)に形質転換し、カルベニシリン (和光純薬, Osaka, Japan) LBプレート (ナカライテスク, Kyoto, Japan) を用いて選択培養した。生育したコロニーを LB/Car 培地で37°C、一晩振とう培養し、アルカリプレップ法によりプラスミドを精製した。

2.5 取得したクローンの塩基配列解析

得られたプラスミドを *EcoRI* で消化し、電気泳動により目的のサイズのバンドがサブクローニングされていることを確認した。確認されたプラスミドのポリエチレングリコール沈殿を行い、濃度を測定した。200ngのプラスミドDNAに0.8 µl 2.0µM M13 Primer M4プライマー (最終濃度1.6µM)、0.5µl Big dye premix (Applied Biosystems, Tokyo, Japan)、1.5µl 5×sequencing buffer (Applied Biosystems, Tokyo, Japan)を加え滅菌水で10µlにした後、96°Cで1分の後、96°Cで10秒、50°Cで5秒、60°Cで4分を1サイクルとして、25サイクルのPCR反応を行った。反応後、PCR産物のエタノール沈殿を行い、乾燥させたペレットに15µl Hi-Di formamide (Applied Biosystems, Tokyo, Japan)を加えた。攪拌して溶解した後、95°Cで3分間の変性処理を行い、その後氷上で急冷して3170 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Tokyo, Japan)により塩基配列を調べた。塩基配列は、設計した *hFAD3* の配列と比較することで確認した。

3. 結果

アマ幼弱種子から単離した *FAD3* cDNA の哺乳動物細胞での発現効率を向上させるため、アミノ酸配列自体には変更を加えることなく遺伝子のコドン使用頻度が哺乳動物細胞で最適となるよう塩基配列の変更を行った。アマ由来 *FAD3* cDNA の塩基配列を、ヒトのコドン使用頻度に近づけた塩基配列 (ヒト化 *FAD3*, *hFAD3*) を設計した。また、開始コドンにはコザック配列を配した。その結果、意図したとおりの再構築遺伝子 *hFAD3* が構築できた。得られた *hFAD3* の配列はもとの *FAD3* cDNA の全塩基1202bpのうち83塩基が変更されていた。この *hFAD3* の塩基配列とアマ由来の *FAD3* cDNA を図2に示した。

			M S P P N S M G M E A A H P T A A S N G V D V T N G
FAD3cDNA	1	-----ATGAGCCCTCCAAACTCCATGGGAATGGAAGCTGCTCATCCAACCGCCGACAAAGCGTGCAGCTACGACACGGG	
hFAD3	1	AAGCTCCACCATGTCCTCCAAACTCCATGGGAATGGAAGCTGCTCATCCAACCGCCGACAAAGCGTGCAGCTACGACACGGG	
		A A A K P D F D P S E A P P F K I A D I R A A I P P H C W V	
FAD3cDNA	79	GCCGCCGCTAAACAGATTTCGATCCGAGCGAGGCTCCGCTCAAGATTCGCCACATCCGCGCCGCAATCCCTCCGCAATGCTGGGTG	
hFAD3	90	GCCGCCGCTAAACCGATTTCGATCCGAGCGAGGCTCCGCTCAAGATTCGCCACATCCGCGCCGCAATCCCTCCGCAATGCTGGGTG	
		K N P W R S L S Y V L R D A V V I L A F A A V A L K L D L W	
FAD3cDNA	169	AAGAATCCATGGCGGTCCCTCAGCTACGCTTACGGAGCCGTCGTCATTCTCGCATTCGCCGCCGCTGCACTCAAGCTCGACCTCTGG	
hFAD3	180	AAGAATCCATGGCGGAGCTCAGCTACGCTTCCGGAGCCGTCGTCATTCTCGCATTCGCCGCCGCTGCACTCAAGCTCGACCTCTGG	
		A L W P L Y W V A Q G T M F W A V E V L G H D C G H G S F S	
FAD3cDNA	259	GCTCTGGCCGCTCTACTGGTTCGCTCAGGGACATATGTTTGGGCTGTCTTGTCTCGGCCACGATGTGGCCATGGAAGCTCTCG	
hFAD3	270	GCTCTGGCCGCTCTACTGGTTCGCTCAGGGACATATGTTTGGGCTGTCTTGTCTCGGCCACGATGTGGCCATGGAAGCTCTCG	
		D S Y W L N N V V G H V L H S A I L V P Y H G W R I S H K T	
FAD3cDNA	349	GATAGCTATTGGCTGAACAATGTGGTGGGATGCTCTGCAATTCGCAATCCTTGTGCCTTACCATGGATGGAGAAATCAGCCACAAAACC	
hFAD3	360	GACAGCTATTGGCTGAACAACGTGGTGGGATGCTCTGCAATTCGCAATCCTTGTGCCTTACCACGGATGGGCTCAGCCACAAAGACC	
		H H Q N H G N V E K D E S W V P L P E K V Y K N L D T S T K	
FAD3cDNA	439	CACCACCAGAATCATGGCAATGTTGAGAAAGATGATCATGGTTCGCTGCCTGAGAAAGTGTACAAGAACCTAGACACAAGCACAAAAC	
hFAD3	450	CACCACCAGAATCAGGCAATGTTGAGAAAGATGATCATGGTTCGCTGCCTGAGAAAGTGTACAAGAACCTAGACACAAGCACAAAAC	
		F M R F T I P L P M F A Y P I Y L W R R S P G K K G S H F N	
FAD3cDNA	529	TTTCATAGGTTCACTATCCGCTCCCAATGTTTGGCTATCCCTATCTACTTGTGGAGGAAAGCCAGGAAAGAAAGGTTCCCATTTCAAT	
hFAD3	540	TTTCATAGGTTCACTATCCGCTCCCAATGTTTGGCTATCCCTATCTACTTGTGGAGGAAAGCCAGGAAAGAAAGGTTCCCATTTCAAT	
		P Y S D L F A P Q E R K S V L V S T I S W I S M A L I L L Y	
FAD3cDNA	619	CCCTACAGTGACCTGTTTGGCCACAGGAAAGGAAATCAGTCTTAGTCTCCACCATCTCTTGGATTTCCATGGCCCTAATCTCTCTAC	
hFAD3	630	CCCTACAGTGACCTGTTTGGCCACAGGAAAGGAAATCAGTCTTAGTCTCCACCATCTCTTGGATTTCCATGGCCCTAATCTCTCTAC	
		A S F L E G F L T V F K V Y G V P Y L I F V A W L D M V T Y	
FAD3cDNA	709	GCCTCCTTCCCTTTTGGTTTCCTCACTGCTTCAAGGTCTATGGCGTCCCTACCTGATATTTGTGGCGTGGCTGGACATGGTGACATAC	
hFAD3	720	GCCTCCTTCCCTTTTGGTTTCCTCACTGCTTCAAGGTCTATGGCGTCCCTACCTGATATTTGTGGCGTGGCTGGACATGGTGACATAC	
		L H H H G H E E K L P W Y R G K E W S Y L R G G L T T V D R	
FAD3cDNA	799	CTGCACCACCACGGGCACGAAAGAGAAGCTGCCATGGTAGACAGGAAAGAGTGGAGCTACCTGCCTGGAGGCTGACCAACCGTAGATAGA	
hFAD3	810	CTGCACCACCACGGGCACGAAAGAGAAGCTGCCATGGTAGACAGGAAAGAGTGGAGCTACCTGCCTGGAGGCTGACCAACCGTAGATAGA	
		D Y G I I N N I H H D T G T H V T H H L F P Q I P H Y H L V	
FAD3cDNA	889	GATTACGGCATATCAACAACATCCACCACGACATCGGCACCCACGATTCACCATCTCTTCCCTCAAATCCCTCACTACCATCTCGTA	
hFAD3	900	GATTACGGCATATCAACAACATCCACCACGACATCGGCACCCACGATTCACCATCTCTTCCCTCAAATCCCTCACTACCATCTCGTA	
		E A T K E A K S V L G K Y Y R E P K K S G P E P E H L F D N	
FAD3cDNA	979	GAGCCGACAAAGGAAGCAAGTCCGTGCTAGGGAAGTACTACAGAGCCGAAAGAAATCAGGGCCTTCCCATTCCTACTGTTTCGACAAAC	
hFAD3	990	GAGCCGACAAAGGAAGCAAGTCCGTGCTAGGGAAGTACTACAGAGCCGAAAGAAATCAGGGCCTTCCCATTCCTACTGTTTCGACAAAC	
		L V R S L G E D H Y V S D A G D V V F Y Q S D P D I F Q F S	
FAD3cDNA	1069	TTGGTGCAAGCCTTGGCGAAGATCACTATGTGAGTGAAGCAGGGGATGTCGTGTTCTATCAGTCAGACCCAGATATCTTCCAGTTTTC	
hFAD3	1080	TTGGTGCAAGCCTTGGCGAAGATCACTATGTGAGTGAAGCAGGGGATGTCGTGTTCTATCAGTCAGACCCAGATATCTTCCAGTTTTC	
		K S K S K S A *	
FAD3cDNA	1149	AAGTCCAAGTCCAAGTCTGCCTGA-----	
hFAD3	1170	AAGTCCAAGTCCAAGTCTGCCTGATAAGGATCC	

図2 アマ由来 *FAD3* cDNA と再構築した *hFAD3* 遺伝子の比較

1 段目: アマ由来 *FAD3* のアミノ酸配列。四角はヒスチジンクラスターを示している。

2 段目: アマ由来 *FAD3* cDNA。3 段目: 再構築した *hFAD3* 遺伝子配列。

黒字は変更された塩基を示す。

4. まとめ

本研究において、植物由来の遺伝子をヒトの高頻度コドンに変更することに成功した。最適化のためコドン使用頻度を変更する方法としては PCR 法が用いられている^(15, 16, 20-22)。本研究の使用頻度の最適化は 1202bp のうち 83bp を変更し、変更する塩基は一部の配列に集約せず、全体に均等に配置させた。また、界の異なる遺伝子の最適化のため、一部の配列だけでなく全長を再構築することにした。そのため、*FAD3* cDNA の全長と 70-90 塩基の長鎖の合成オリゴを複数もちい、11 回の PCR を要した。このことから、変更する塩基を数カ所に集めること、PCR だけでなく特異的な制限酵素サイトを用いることなどで、もっと効率良く最適化ができるのではないかと考えられた。

今後は、本研究で得られた再構築遺伝子の発現効率を検討するために、哺乳動物細胞における *hFAD3* の酵素活性について検討していく考えである。

参考文献

- (1) Uauy, R., Mena, P., Rojas, C. (2000) Essential fatty acids in early life: structural and functional role. *Proc. Nutr. Soc.* 59, 3-15.
- (2) Uauy, R., Peirano, P., Hoffman, D., Mena, P., Birch, D., Birch, E. (1996) Role of essential fatty acids in the function of the developing nervous system. *Lipids* 31, S167-S176.
- (3) Connor, W. E. (2000) Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 171S-175S
- (4) Ma, D. W. L., Seo, J., Swizer, K. C., Fan, Y. Y., McMurray, D. N., Lupton, J. R., Chapkin, R. S. (2004) n-3 polyunsaturated fatty acids throughout the cancer trajectory: influence on disease incidence, progression, response to therapy and cancer-associated cachexia. *Nutr. Res. Rev.* 17, 177-192.
- (5) Thoenes, S. R., Tate, P. L., Price, T. M., Kilgore, M. W. (2000) Differential transcriptional activation of peroxisome fatty acids in MCF-7 Cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 160, 67-73.
- (6) Calder, P.C. (2006) n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*, 83, 1505S-19S.
- (7) 熊谷 朗 (1994) EPA の医学-疫学・栄養学から臨床まで-, 第一版, P.3, 4, 東京
- (8) Simopoulos, A. (2000) Human requirement for n-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry Sci.* 79, 961-970.
- (9) Saeki, K., Matsumoto, K., Kinoshita, M., Suzuki, I., Tasaka, Y., Kano, K., Taguchi, Y., Mikami, K., Hirabayashi, M., Kashiwazaki, N., Hosoi, Y., Murata, N., Iritani, A. (2004) Functional expression of $\Delta 2$ fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 6361-6366.
- (10) Hirose, M., Masuda, A., Ito, N., Kamano, K., Okuyama, H. (1990) Effects of dietary perilla oil, soybean oil and safflower oil on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DNM)-induced mammary gland and colon carcinogenesis in female SD rats. *Carcinogenesis* 11, 731-735.
- (11) Kane, J. F. (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* 6, 494-500.
- (12) Ikemura, T. (1985) Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol. Biol. Evol.* 2, 13-34
- (13) Holm, I. (1986) Codon usage and gene expression. *Nucleic Acids Res.* 14, 3075-3087.
- (14) Kanaya S., Yamada, Y., Kinouchi, M., Kudo, Y., Ikemura T. (2001) Codon usage and tRNA gene in eukaryotes: correlation of codon usage diversity with translation efficiency and with CG-dinucleotide usage as assessed by multivariate analysis. *J Mol Evol* 53, 290-298.
- (15) Massaer, M., Mazzu, P., Haumont, M., Magi, M., Daminet, V., Bollen, A., Jacquet, A. (2001) High-level expression in mammalian cells of recombinant house dust mite allergen ProDer p 1 with optimized codon usage. *Int Arch Allergy Immunol*, 125, 32-43.
- (16) Kim, C. H., Oh, Y., Lee, T. H. (1997) Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells. *Gene* 199, 293-301.
- (17) Narum, D. L., Kumar, S., Rogers, W. O., Fuhrmann, S. R., Liang, H., Oakley, M., Taye, A., Sim, B. K. L., Hoffman, S. L. (2001) Codon optimization of gene fragments encoding *Plasmodium falciparum* merozoite proteins enhances DNA Vaccine protein expression and immunogenicity in mice. *Infection and Immunity* Dec., 7250-7253.

- (18) Haas, J., Park, E. C., Seed, B. (1996) Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Current Biology* 6 (3), 315-324.
- (19) Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283-292.
- (20) Sinclair, G., Choy, F. Y. M. (2002) Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methlotrophic yeast. *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 26, 96-105.
- (21) Te'o, V. S. J., Criferszky, A. E., Bergquist, P. L., Nevalainen, K. M. H. (2000) Codon optimization of xylanase gene *xynB* from the thermophilic bacterium *Dictyoglomus thermophilum* for expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiology Letters* 190, 13-19.
- (22) Batard, Y., Hehn, A., Nedelkine, S., Schalk, M., Pallett, K., Schaller, H., Werck-Reichhart, D. (2000) Increasing expression of P450 and P450-reductase proteins from monocots in heterologous system. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 379 (1), 161-169.

英文抄録

Codon Optimization of Plant Fatty Acid Desaturase (*FAD3*) to Enhance Expression in Mammalian Cells

Yoriko Indoh¹, Iwane Suzuki², Kazuya Matsumoto^{1,3,4}, Yoshihiko Hosoi^{1,3,4},
Norio Murata⁵, Akira Iritani^{1,3,4} and Kazuhiro Saeiki^{1,3,4}

Recently, long chain n-3 fatty acids 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 coronary artery disease, cancer and inflammatory diseases. We have isolated an *FAD3* gene from immature seeds of scarlet flax and examined its functional expression in transgenic yeasts and mammalian cells, but the expression level of the *FAD3* was extremely low. In this study, to enhance the expression level of the *FAD3* gene, codon usage of flax *FAD3* cDNA was optimized to human high-frequency codon usage. The sequence of optimized *FAD3* (humanized *FAD3*; *hFAD3*) was designed to correspond to human high-frequency codon usage. Twenty primers for optimization of the *FAD3* were synthesized based on *hFAD3* sequence (70-90 bp for each fragment). The optimization of *FAD3* was carried out by PCR (11 reactions). As a result, we obtained the optimized *FAD3* cDNA. The *hFAD3* contains 83 silent mutations, leaving the amino-acid sequences identical to the original *FAD3* cDNA from flax seeds.

1. Division of Biological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

2. Laboratory of Plant Physiology and Metabolism, University of Tsukuba, Tsukuba City, Ibaraki 305-8572, Japan,

3. Department of Mechanical Engineering and Biomimetics, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

4. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama, 649-0017, Japan

5. National Institute for Basic Biology, Okazaki City, Aichi 444-8585, Japan