

魚類へのL-グルノラクトンオキシダーゼ遺伝子の導入—ビタミンC合成能付与の試み—

京都大学農学部水産学科 豊原治彦

ビタミンC（アスコルビン酸）は1932年にヒトの抗壞血病因子（後にコラーゲン合成の際のプロリン水酸化反応の促進作用によることが判明）として同定された低分子の水溶性必須栄養素である。図1に示すように、ビタミンCは分子内エンジオール基を持つ。そのため、容易に酸化されてデヒドロアスコルビン酸に変化し、生体内において還元的環境を作り出すことにより、種々の生化学反応の安定的進行に寄与しているものと考えられる。現在ではその他フリーラジカル消去機能による抗癌、老化防止、免疫能の活性化、抗ストレス作用など種々の生理作用を持つことも知られている。

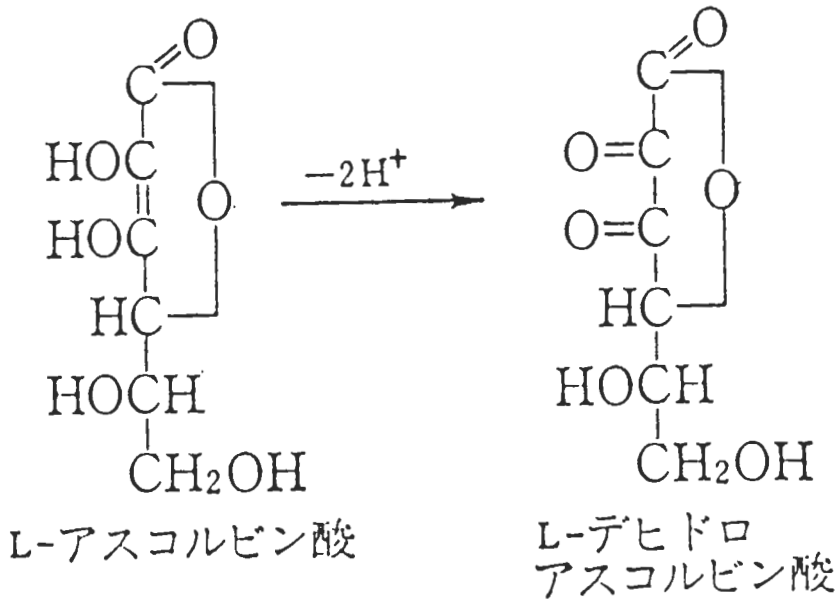


図1. ビタミンC（L-アスコルビン酸）は自らL-デヒドロアスコルビン酸へと酸化されることで生体内において還元的環境を作り出し、種々の生化学反応の円滑な進行に寄与していると考えられる。

しかし、実は圧倒的大多数の哺乳類、鳥類、爬虫類、両棲類は自らビタミンC合成能を有するため、外部から餌料としてビタミンCを摂取する必要はない。つまりこれらの生物にとっては、ビタミンCはビタミンではない。しかし、魚類の中にはビタミンC欠乏により骨曲がり、出血などいわゆる欠乏症を起こすものがあることから、種類によってはビタミンC合成能を持たないものがあることが予想されていた。

本講では、私達の研究室で最近行なわれた魚類のビタミンC合成能の有無についての酵素レベルからの検討と、遺伝子組換えによる魚類へのビタミンC合成能の付与の試みについて紹介したい。

1. ビタミンC合成能の進化

図2に示すように、動物組織においてはビタミンCはウロン酸サイクルのL-グルロン酸から分岐し、L-グルノラクトンを経て生合成される（植物ではこれとは違った経路を経て合成される）。¹⁾

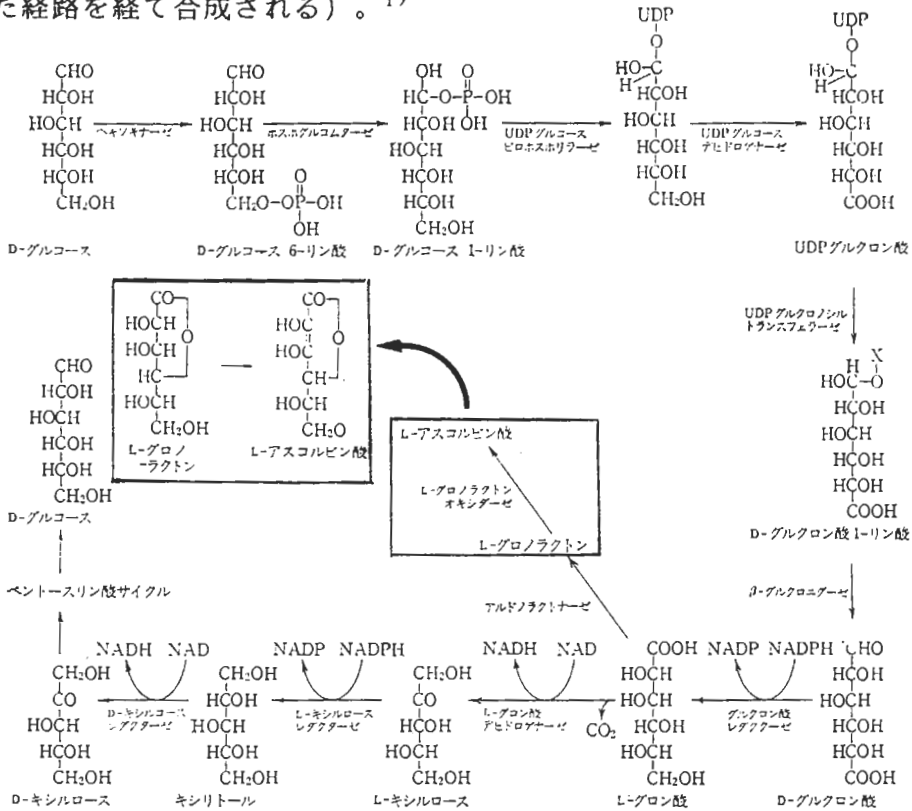


図2. ウロン酸サイクルのL-グルロン酸からアルドナーゼの働きでL-グルノラクトンが生じ、さらにL-グルノラクトンオキシダーゼの働きでビタミンC (L-アスコルビン酸) が生合成される。ビタミンC合成能をなくした生物は、このL-グルノラクトンオキシダーゼの遺伝子に変異を起こしているものと考えられている。

ウロン酸サイクルはグルクロン酸抱合解毒やムコ多糖類合成を担う経路であり、動物界に広く分布しているが、この分岐経路であるビタミンC合成経路の最終段階、L-グルノラクトンからビタミンCへの変換を触媒するL-グルノラクトンオキシダーゼ (GLO) は、ヒト、サル、モルモット、ゾウ、ある種のコウモリ、鳥類、昆虫などで欠損しており、そのためこれらの生物はビタミンCを生合成できない。ヒトではその遺伝子に突然変異による数々の塩基の欠失や挿入が生じていることが証明されており、分子進化的研究からヒトの祖先は約2500万年前に、ビタミンC合成能を放棄したことが明かにされている。²⁾ この理由としては次のような可能性が考えられる。おそらく、この時代にヒトの祖先はビタミンCを大量に含む食物(おそらく果物類)に恵まれた環境下で長く過ごしたため、その中の特定の個体のGLO遺伝子に突然変異が生じた。ビタミンCに恵まれない環境下なら本来この個体は淘汰されるはずであったが、当時のようにビタミンC源がふんだんに利用できる環境下では、逆にこの個体の子孫は遺伝子節約(gene saving)の観点から他集団に対して優位に立ち、ついには全集団を支配するに到った。そして、それ以降その種から派生した種は、ビタミンC合成能を失ってしまった。多分、霊長類以外のGLOを欠く動物についても、同様の現象が進化の過程で起こったものと予想される。

一方、魚類のビタミンC合成能の有無についてはいまなお多くの議論がなされているおり、結論は得られていない。しかし、私達の最近の研究から、

(1) 哺乳類で用いられている活性測定条件である中性付近で反応させると、円口類のカワヤツメ、板鰓亜綱のアカエイ、肺魚下綱のアフリカ産肺魚ではGLO活性は検出されるが、ほとんどの真骨類(いわゆる漁業の対象となる魚)には検出されない。また、哺乳類ではGLOは肝臓に存在するが、カワヤツメ、アカエイ、肺魚などでは、爬虫類や両棲類と同様、腎臓に存在する。

(2) カワヤツメGLOの至適pHは9.0付近にあり、哺乳類GLOにくらべかなりアルカリ性域によっている。そこで、各種真骨類についても、アルカリ性域での活性を再検討してみると、コイとニジマスの腎臓には微弱な活性(カワヤツメの約1/20~1/70)が検出されたが、マダイ、ブリ、ヒラメではアルカリ性域でも活性は検出されなかった。

(3) 真骨類のうちコイ、ニジマス腎臓にはカワヤツメGLO抗体と交叉するタンパク質が存在したが、マダイ、ブリ、ヒラメ腎臓には検出されなかった。

以上の結果から、真骨類ではGLOは遺伝子レベルで欠損しているか、あるいは遺伝子は存在しタンパク質にまで翻訳されていても、その酵素として活性は微弱であり、ビタミンC要求量のかなり部分を食物摂取する必要があるものと推察された。

2. 魚類におけるビタミンCの栄養学的役割とその欠乏症³⁾

魚類においてもビタミンCは、生体内において還元的環境を作り出すことにより、種々の生体反応を円滑に進める働きをしているものと予想される。現在知られている魚類のビタミンC欠乏症は以下のようなものである。

ブリ：食欲不振、成長低下、体色黒変、脊椎湾曲、斃死

ウナギ：食欲不振、成長停滞、出血

ニジマス：脊椎湾曲、眼球突出、出血

クルマエビ：灰白色化、斃死

一方、ヒトの場合と同様、魚類においても高用量投与は、孵化率の上昇、細菌やウイルスに対する抵抗性の向上、免疫機能の向上、重金属・農薬などの毒性緩和など種々の薬理効果のあることが報告されている。なお、現在ビタミンCはアスコルビン酸あるいはアスコルビン酸カルシウムとして、ブリ、マダイ、コイ、ウナギ、ニジマス、アユ餌料への添加が認可されているが、一般に餌料中での安定性が悪いため、安定化ビタミンC製剤（リン酸エステル、硫酸エステルなど）や被膜型製剤（エチルセルロースやシリコン被膜など）の開発が進められている。

3. 魚類へのビタミンC合成能付与の試み

このような背景から、私達はすでに応用生化学研究所の錦見・八木らによりクローニングされていたラット腎臓GLOのcDNA（もちろんラットはビタミンCを自ら合成できる）の魚類への導入を試みた。なお導入対象魚としては、すでに実験条件が整っていたメダカを選んだ。メダカは真骨類のなかの刺鰭上目に分類され、ダツやサンマの近縁種と考えられている（メダカは実はコイやフナとは縁遠い魚である）。したがって、マダイやヒラメと同様、メダカGLOは遺伝子レベルで欠失しているか、あるいは遺伝子は生き残っていてもその翻訳産物である酵素の機能は低下してしまっているものと推測された。実際、メダカの各種組織についてGLO活性の有無を検討してみたが、まったく活性は検出されなかった。

遺伝子を導入するにあたっては、導入遺伝子を宿主細胞内で発現させるためのプロモーターに導入遺伝子を連結したベクターを構築する必要がある。この実験では、SV40とよばれるサルウィルスの後期プロモーター（ウィルス生活環の後半で発現される遺伝子の転写に関わることからこう呼ばれる）にラット腎臓GLOのcDNAを連結したベクターを使用した。

まず予備実験として、環状（ベクターは本来環状のものなので、何も手を加えていないものをそのまま使用）ベクターと直鎖状（ベクター全体をその性能に影響を及ぼさない部分で1箇所切断したもの）ベクターとで生存率、孵化率及び遺伝子導入率に及ぼす影響を比較した。なお、卵への導入は受精卵細胞質へのマイクロインジェクションによった。その結果、直鎖状ベクターでは導入1日後に75%が生存していたが、環状ベクターでは生存率は46%に低下した。孵化率（メダカは26℃で受精後10～14日後に孵化）は直鎖状ベクターで64%、環状ベクターで21%であった。このようにベクターの形状により生存率や孵化率に大きな違いが認められたが、残念ながら現在のところその理由については不明である。次に遺伝子導入率を、孵化直後の稚魚を用いて比較したところ、直鎖状ベクターで導入卵の82%、環状ベクターで60%という値が得られた。したがって孵化率と導入率を合わせて考えると、直鎖状ベクターは環状ベクターにく

らべて約4倍の効率で導入個体が得られることがわかった。一般に導入された外来遺伝子は、一旦たがいに結合し高分子量の複合体を形成した後、その一部が切断を受け宿主ゲノムに取り込まれるものと考えられている。したがって、直鎖状のものの方が環状のものにくらべて導入率が高いのは、直鎖状の方が高分子複合体を形成しやすいためと推測される。

以上の結果を受け、直鎖状ベクターを17個の受精卵に導入し、14尾の孵化稚魚を得、最終的に4尾の成魚を得ることができた。なぜか得られた成魚はすべて雄であった。理由は後に述べるが、この世代の導入魚(F_0)では導入遺伝子は全身の細胞に一様に分布しているわけではなく、モザイク状に存在している。しかし、もし生殖細胞(雌では卵子、雄では精子)の一部に導入遺伝子が組み込まれていれば、その生殖細胞から生まれた次の世代(F_1)は全身に導入遺伝子を持つ。つまり、この段階で導入した遺伝子は遺伝的に固定化されたことになる。今回の実験では、4尾の F_0 の雄をそれぞれ非導入雌と交配して得られた F_1 を調べた結果、すべての雄の子孫に導入遺伝子の存在が確認された。つまり、 F_0 の4尾の雄すべての精子細胞(の一部)にラットGLOのcDNAが組み込まれていたわけである。

そこで次に得られた F_1 を成魚に育て、導入したラットGLOcDNAの発現を調べた。もし真骨類であるメダカでGLOが発現しているとするれば、進化的にみて腎臓で発現していることが予想される。しかし、この実験で用いたベクターには発現組織を決定するプロモーター領域は含まれておらず、その代わりに発現組織を限定しないウィルス系プロモーターであるSV40後期プロモーターが使用されている。したがって導入魚でGLOが発現しているなら、全身の細胞でくまなく発現しているはずである。なおこの実験では、腸内細菌由来のGLO類似酵素の活性を測りこんでしまう危険性を避けるため、頭部抽出液を用いてGLO活性を測定した。その結果、図3に示すようにある1尾の F_0 由来の F_1 すべてに活性が見出された。この系統にだけ活性が検出されたのは、おそらく4尾の F_0 のうちこの雄においてのみ、導入遺伝子がゲノム中で転写を受け易い位置に組み込まれたためと思われる。しかし、残念ながらGLO活性を発現している F_1 の体内ビタミンC濃度が、非導入個体にくらべて特に高いとはいえ、この酵素を導入したことでビタミンC合成能が付与されたかどうかについては確認できなかった。また図2に示したように、ウロン酸サイクルからの分岐点である、L-グルロン酸からL-グルノラクトンへの変換を触媒するアルドノラクトナーゼの魚類における存在については検討であり、もしこの酵素も欠損を受けているとGLOの導入だけではビタミンC合成能を付与することは不可能になる。現在GLO導入メダカの F_2 、 F_3 が誕生しており、今後これらの魚を用いてビタミンC欠乏に対する耐性などを非導入魚と比較することで、ビタミンC合成能の有無について推測することも可能であろう。

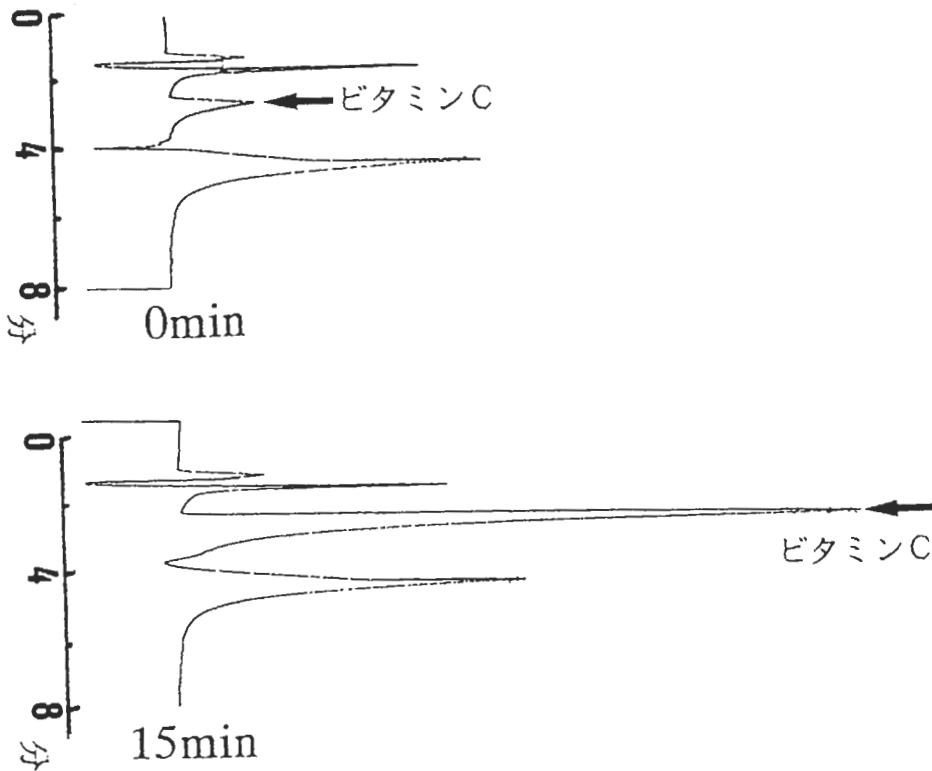


図3. ラットL-グルノラクトンオキシダーゼ (GLO) cDNAを導入されたメダカ頭部抽出液を用いて測定したGLO活性。活性測定は、L-グルノラクトンを基質とし、pH7.0で15分反応させ、生じたビタミンCを逆相カラムで分離後、電気化学的に検出することによった。ここに示したのは、反応前 (0min) と反応後 (15min) のクロマトグラムである。反応後には矢印で示したビタミンCのピークが増加し、このメダカでGLO活性が発現していることがわかる。なお、0minで検出されるビタミンCは、メダカ抽出液から持ち込まれた内在性のものであり、この値から体内ビタミンC量を知ることができる。遺伝子導入魚と非導入魚でこの値を比較したところ、顕著な違いは見出されず、GLOの導入によりビタミンC合成能が付与されたかどうかについては不明である。

4. 今後のトランスジェニック技術応用の展開

交配による選抜・育成を繰り返すという時間と手間のかかる手段によることなく、一足飛びに望ましい形質を持った生物を作出しうるトランスジェニックの技術は、他の育種分野と同様、魚類育種分野においても最初は夢の技術として受け止められた。しかし、現実には単に遺伝子導入が可能になったからといって、いきなり望ましい形質を持った魚を作り出せるわけではなかった。これは筆記用

具さえあればすぐにすぐれた設計図が描けるとは限らないのと同じことであろう。つまり、生物（魚）という超精密機械の構造を分子レベルで詳細に理解できてはじめて、自由自在に望む形質を付与できるようになるわけである。そこで、ここでは今後のトランスジェニック技術応用の展開を考えるために、いくつかの技術的ポイントについて現在の到達点と今後の応用の方向性を考えてみたい。

(1) 遺伝子導入法： マイクロインジェクションあるいはエレクトロポレーションなどの一般的な遺伝子導入法が魚類の卵（あるいは一旦精子に導入し、その精子を用いて受精させる精子ベクター法もある）にも適応可能なこと、さらに魚類は体外受精であり、かつ哺乳類にくらべ一度に多くの卵が得られることなども幸いして、卵への遺伝子導入法についてはすでに実用段階にあるといえる。ただし、現在開発されている遺伝子導入技術は、メダカ、ゼブラフィッシュ、ニジマス、フナなど限られた魚種についてのものであり、卵膜の硬さ、透明度、卵の大きさ、発生の速度などは魚種により様々なことから、今後、別の魚種で実用化していくためには魚種ごとにそれなりの工夫が必要であろう。

また、最近になってマウスに続いてメダカでも分化全能性をもつ胚性幹細胞株が樹立された。これまでの卵への直接導入法では、宿主ゲノムへの導入遺伝子の組み込みは偶然に頼るしかなかったが、胚性幹細胞株が樹立されたことで、まず一旦この細胞へ遺伝子を導入しておき（薬剤耐性で選別）、次にこれらの細胞を発生初期段階の受精卵に注入することにより高い確率で遺伝子導入個体を得ることが可能となった。このようにして作出されたF₀のうち生殖腺細胞に導入遺伝子をもつ個体を選抜し（F₀では細胞分裂がかなり進行した段階で宿主ゲノムへの導入遺伝子の組み込みが起こるので、成熟個体内において導入遺伝子はモザイク状に分布することになる）、交配により導入遺伝子の固定化を行なう。このようにして得られたF₁以下の子孫については、1細胞（精子細胞あるいは卵子細胞）の段階から導入遺伝子がゲノム中に存在するので、この細胞が分裂して生じた身体中の細胞すべてに導入遺伝子が存在することになる。

(2) 導入遺伝子の発現： これまでにかんりの種類のトランスジェニック魚が作出されてきたが、実際に導入遺伝子が発現した例はそれほど多くない。さらに導入遺伝子が発現し、見た目の形質にまで影響を与えた例はメラニン凝集ホルモン導入による白化メダカなどに限定される。この理由としては、宿主ゲノムにおける組み込み位置を制御できないこと、および発現のためのプロモーターとして適当なものが少ないことが挙げられる。今後宿主ゲノムの特定の位置に遺伝子を導入するためのターゲティングベクターの開発、あるいは高発現ないしは人為的発現誘導（温度、金属イオンや薬剤添加など）が可能なプロモーターの開発が必要となろう。

(3) 導入遺伝子の選択： トランスジェニック技術の応用は、便宜的には以下の4分野に大別することができる（但し、この分類はあくまで便宜的なものであり、本講で取り上げたGLOの導入などは①から④のいずれにも分類しうる）。

① 成育特性の改良： 成長促進、餌料効率の向上、成熟期間の短縮・遅延、消化特性の改良。

②各種耐性の改良：温度耐性、塩類耐性、耐病性、低酸素耐性、ストレス耐性など。

③品質機能の改良：栄養成分、肉質（量）、体形、体色など。

④生物機能の改良：物質生産動物としての利用、環境モニタリング魚の作出など。

このように応用の可能性としてはいろいろ考えられるが、現実的にこれまでに実際に行なわれた応用研究のほとんどは哺乳類成長ホルモン導入による魚体の大型化を目指したものであった（しかし、現在のところ残念ながら目立った成功には到っていない）。これは、いわゆる有用形質が単独の遺伝子としてクローニングされている例がきわめて少ないことによる。その観点から、ヒートショックタンパク遺伝子導入による温度やストレス耐性の付与などは、現時点で実験可能な段階にあるといえよう。

最後に④の応用例として現在私達が計画している研究を紹介したい。多くのタンパク性有用物質の組換え体は通常大腸菌を用いて生産されているが、原核生物である大腸菌では翻訳後の修飾がうまくいかず、生物活性のある組換え体が得られないことがある。このような物質の場合、現状では培養細胞、特にカイコのバキュロウイルス系を用いて生産されているが、無菌操作が必要、血清などコスト面で高くつくなど問題点も多い。そこで、私達は精巢特異的な発現が期待されるプロモーターを用いた物質生産用トランスジェニック魚の開発を計画している。有用物質の組換え体を精巢に発現させ、それを精液として回収すればその魚を犠牲にすることもなく、簡単にしかも安価に高純度の組換え体を得られる。また、食用としてトランスジェニック魚を利用する場合にはpublic acceptanceや法的規制など障害も多いが、この場合には食用を目的とせず、またすべての実験を遺伝子組換え実験エリアで行なうことが可能である。したがって、適当な精巢特異的発現プロモーターさえクローニングできれば、近い将来実用化が可能と思われる。

参考文献

- 1) ビタミン学 (II)、p.567-599、日本ビタミン学会編、東京化学同人 (1980)
- 2) 蛋白質 核酸 酵素、35、2866-2673 (1990)
- 3) New Food Industry、31、37-44 (1989)