

東京大学農学系研究科  
応用遺伝学教室 東條英昭

家畜の遺伝的改良は、人工授精や体外受精などの人為的操作が加わるものの、基本的には、能力の高い個体同士を交配し、その子孫の能力を検定して、それらの中からさらに優れた形質を持つ個体を選抜する方法を繰り返すことで行われてきた。したがって、両親の染色体の任意な組み合わせにより、有益な遺伝子と同時に望ましくない遺伝子も子孫に伝わるので、有益な遺伝子だけを子孫に蓄積していくためには、長い年月と多大な労力を費やさなければならない。しかし、先人の忍耐強い努力によりこれまでに各種の家畜において遺伝的改良が飛躍的に成し遂げられてきた。

ところで、近年の家畜における体外受精、胚の凍結保存、胚の移植、胚の性別判定、核移植などの技術の発展は目覚ましく、これらが、家畜の育種に応用されれば、家畜の遺伝的改良は一層促進されることが予想される。しかし、一方では、このような技術が如何に駆使されたとしても、膨大な遺伝的変異によって構成されている家畜集団を、特定の遺伝的形質を目標に選抜改良していくには、各々と限界があろう。ところが、最近の遺伝子工学や発生工学の驚異的な進展によって、染色体上に散在する膨大な数の遺伝子の中から、或る特定の遺伝子をその本体であるDNAの形で取り出し、しかも、それを動物に導入して個体レベルで機能させることが可能になった。このような遺伝子導入技術を家畜に応用すれば、従来の育種法では不可能であった特定の遺伝子のみを家畜に導入することが可能となり、遺伝子導入技術が、家畜の遺伝的改良の新たな手段として応用されようとしている。

### 1. 外来遺伝子の導入法

哺乳類の生殖系列（生殖細胞）へ外来性の遺伝子を導入する手段には、主として、受精卵の前核に直接遺伝子DNA溶液を注入するDNA顕微注入法、レトロウイルスを導入ベクターとして利用する方法、さらには、胚性幹細胞を利用する方法の3通りの手段が用いられている。そのうち、哺乳類家畜においては、DNA顕微注入法が、一方、ニワトリにおいては、主に、組換えレトロウイルスを胚盤に注ぐ方法が用いられている。

### 2. 形質転換（トランスジェニック、Tg）動物の特徴

受精卵の前核にDNAを注入する方法で作出されたTg動物は、以下のような共通の特徴を有する。まず、外来DNAが、前核期の段階で、宿主DNAに組み込まれるので、個体を構成するすべての細胞がヘミ接合体の状態で外来遺伝子を保有する。したがって、次世代からは、外来遺伝子は、宿主遺伝子と同様に、メンデルの遺伝様式に従って、生殖細胞を介して子孫に伝達される。しかし、

DNA注入の時間が遅れるなどの原因で、宿主DNAが複製された後に外来DNAが宿主DNAに組み込まれた場合には、外来遺伝子を保有する細胞と保有しない細胞とから構成されるモザイク個体を得られ、そのため、次世代への外来遺伝子の伝達頻度が現象したり、伝達されないことがある。さらに、外来遺伝子の宿主染色体への挿入状況によっては、次世代に伝達される段階で、外来遺伝子の再構成やメンデル遺伝の法則に従わないなどの現象が観察される。導入された遺伝子の種類や構造によっては、組織特異的に発現したり、発生過程で時期特異的に発現する。しかし、組み込まれた宿主染色体の位置によっては、発現されないことがあり、発現しても、その程度に大きな変異があり、また、概して、遺伝子の挿入コピー数と発現量との間には、相関が見られない。さらに、導入遺伝子の発現によって、個体の生理状態に変化が観察されることがある。その他には、導入遺伝子が組み込まれる染色体上の位置が任意であるため、挿入部位によっては、宿主遺伝子の機能に影響し、発生異常や形態異常などの表現形質に異常が生ずることがあり、挿入突然変異 (insertional mutation) と呼ばれている。

### 3. 導入遺伝子の発現

#### 1) 組織特異的発現

Tg動物において外来遺伝子の組織特異的発現が最初に証明されたのは、免疫グロブリン遺伝子がマウスに導入された研究であり、導入遺伝子が、リンパ組織のみで発現していることが確認された。その後、多数の遺伝子がマウスに導入され、肝臓、脾臓、脳、下垂体、性腺、筋肉、水晶体、小腸、皮膚、乳腺、赤血球、リンパ組織、神経系などで組織特異的に発現する遺伝子が同定されている。これまでに作出された多くのTgマウスの解析結果から、導入遺伝子の構造がタンパクをコードしている構造遺伝子とある程度の長さの5'側及び3'側の領域を保有するゲノムDNAであれば、Tgマウスにおいて、ほぼ組織特異的に発現することが明らかとなった。また、遺伝子の組織特異的発現を制御する必須のDNA領域は、まれに3'側や構造遺伝子内にも存在することが報告されているが、これまでに調べられた大分部の遺伝子では、CATボックスやTATAボックスなどのプロモーター領域を含む5'側領域であることが明らかにされている。したがって、ある特定の遺伝子の5'側調節領域を他の遺伝子の構造遺伝子やcDNAに連結して導入すると、構造遺伝子の種類に関係なく、5'側のシスの調節を受けて、プロモーターに特異的な組織で発現することが確認されている。このことは、特定遺伝子のプロモーター領域を利用すれば目的の蛋白をコードしている遺伝子を異所性に発現させ得ることを示している。

#### 2) 時期特異的発現

高等動物で機能している遺伝子は約5 - 10万個存在すると推定され、それらの一部は、個体発生の過程で、時期特異的に発現すると考えられている。個体発生及び出生後の発育段階で時期特異的に発現する遺伝子の発現調節領域については、組織特異的発現に関与する領域の解析に比べ進んでいない。そのうちで、赤

血球に存在し、酸素の運搬に重要な役割を担っているグロビタンパクをコードする遺伝子群の時期特異的発現を制御する領域についての解析が、Tgマウス用いて精力的に進められている。その他には、マウスメタロチオネイン-I (MT-I) 遺伝子や $\alpha$ -胎児性蛋白遺伝子の発現が妊娠初期に特異的に上昇し、また、マウス・アルブミン遺伝子は、妊娠の18-20日頃に発現が上昇し、さらに、PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) 遺伝子の発現は、分娩時に急上昇することなどが知られている。しかし、これらの発現をシスに制御している領域についてはほとんど解っていない。一方、乳腺で泌乳期に発現が著しく上昇するカゼイン遺伝子や、マウス乳清酸性蛋白(WAP) 遺伝子に関しては、時期特異的発現をシスに制御している領域がかなり明らかにされている。その他には、導入遺伝子がTg動物で高い発現を示すためには、イントロンが含まれている必要のあることが確認されている。

最近、遺伝子の発現をトランスに制御する各種因子の解析も急速に進んでおり、遺伝子発現をシス並びにトランスに制御するさまざまなDNA領域が解明されてくれば、将来、それらのDNA領域を利用することにより、Tg動物での導入遺伝子の発現を、組織特異的だけでなく時期特異的にも制御できるようになるかも知れない。

#### 4. Tg動物の利用

Tg動物の利用としては、まず、人為的に組換えた各種の遺伝子をマウスやラットなどの実験動物へ導入すれば、得られたTg動物を解析することによって遺伝子の構造を機能と対比させて遺伝子発現の調節機構を探ることができる。また、ヒトの病因遺伝子を導入したTgマウスは、ヒト遺伝性疾患の発症機構を分子レベルで探る研究やそれらの治療法の開発に極めて有用なモデルとなる。

ところで、家畜に遺伝子を導入する際には、実験動物の場合に比べ、導入する遺伝子が目的に合った発現を示すかがより重要となる。したがって、家畜に遺伝子を導入する前に、導入遺伝子の生体内での機能を予測しておく必要がある。その意味で、Tgマウスは遺伝子発現のスクリーニングのモデルとしても有用である。一方、外来遺伝子導入技術を家畜へ応用すれば、まず、特定遺伝子を家畜へ導入することにより経済形質の遺伝的向上を図ることができる。実際に、遺伝的に成長の早い家畜を作出しようとして、種々の成長ホルモン(GH)遺伝子がブタやヒツジに導入された。しかし、これまでのところ、期待したようなTg家畜は作出されておらず、かえって、高濃度の外来GHの作用により糖尿病やリュウマチ症などが誘発されている。つぎに、家畜の生産物(乳、肉、卵、毛)の成分組成をコードする遺伝子を導入して、生産物を構成している各種蛋白質成分の組成を遺伝的に改変することが考えられる。例えば、牛乳蛋白質の主成分であるカゼインや乳清蛋白質の成分である $\beta$ -ラクトグロブリンや $\alpha$ -ラクトアルブミンなどの相互の比率を変えることができれば、現在の牛乳に比べて、物理的により安定し、加工・処理が容易な牛乳の得られる可能性がある。

近年、大腸菌や酵母などの微生物や培養細胞を宿主とする体外培養系で、大量

生産された有用蛋白質が広く利用されている。しかし、体外培養系による生産システムには、生成物における糖鎖の付加やプロセッシング、さらには、生成物の細胞外への分泌などに種々の難点がある。そこで、それらの物質をコードする遺伝子を家畜に導入し、家畜体を宿主として大量に生産させることが考えられた。特に、目的の蛋白質をコードする構造遺伝子の upstream に乳腺で特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域を連結した遺伝子を家畜に導入すれば、生産された物質を乳汁に分泌させることができる。事実、このような目的で作出された Tg マウスや Tg ヒツジの乳汁において、幾つかの有用物質が高濃度に分泌された例が報告されている。

### 5. mWAP/hGH 遺伝子導入による Tg マウス

演者らは、これまで Tg 家畜の応用に関する基礎的研究を行っているが、その中で、Tg 家畜による有用物質の大量生産システムの開発を目差した基礎的研究として、ヒト GH を乳汁に分泌する Tg マウスを作成し、それらの解析を進めている。

Dr. R. D. Palmiter 及び Dr. A. C. Andrew から分与された  $P^{MT/hGH}$  及び  $P^{WAP/2.1\text{kb}}$  をもとに、マウス酸性ホエー蛋白遺伝子 (WAP) のプロモーター領域を含む 5' 側 2.5 kb の領域とヒト成長ホルモン (hGH) をコードする 2.1 kb の領域とを連結した mWAP/hGH 融合遺伝子 (4.7 kb) を作製した。Tg マウスの作成は、BDF<sub>1</sub> (C57BL/6J x DBA/2) マウス同士の交配で得た受精卵の前核に DNA (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を顕微注入し、ICR 系の偽妊娠マウスの卵管に移植する方法に従った。DNA の解析の結果、3 匹のいずれも雄マウスで、mWAP/hGH 融合遺伝子の挿入が確認され、それぞれ、5 (No. 3-1), 12 (No. 4-3), 6 (No. 8-1) コピーの mWAP/hGH 融合遺伝子が挿入されていることが判明した。つぎに、3 匹の雄の founder を泌乳能力の高い系統である ICR 系の雌に交配し子孫を得た。子孫のうち、遺伝子の伝達を確認された雌の Tg マウスが 8-9 齢に達した時点で、さらに、ICR の雄マウスと交配させ、妊娠、分娩させた。なお、No. 8-1 系の雌は長期間交配に供したが、いずれも妊娠しなかった。分娩 10-12 日目に適量の乳汁を採取し、脂肪を除去した後、RIA より乳汁中の hGH 量を測定した。まず、対照の ICR 及び No. 4-3 系の乳汁では、hGH は検出されなかった。なお、No. 4-3 系の乳腺から抽出した RNA をノーザン法により解析したが、転写レベルでも発現していなかった。それに対して、No. 3-1 系の乳汁には、 $4.77 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $n=4$ ) の hGH が検出された。

つぎに、乳汁中の hGH が生物活性を有しているかどうかの指標として、乳汁 hGH とラットまたはマウス肝臓の GH レセプターとの結合能を乳汁試料を用い RRA を行ったところ、乳汁の希釈に対応して GH レセプターへの結合率が減少した。このことは、間接的ではあるが、乳汁中の hGH が生物活性を有していることを示すものである。さらに、血液中に hGH が検出されるかどうかを調べた結果、ICR 系及び No. 4-3 系では、乳汁の場合と同様に、hGH は全く検出されなかった。一方、No. 3-1 と No. 8-1 の Tg 系統では、雌雄において hGH が検出され、いずれも宿主の血中 GH 量よりも高い値を示した。両 Tg 系統間の血中 hGH 量を比較すると、雌雄共に、No. 3-1 系に比べ、No. 8-1 の系で有意に高かった。また、両系統における雌雄ある

いは、泌乳または非泌乳中における血中hGH量を比較すると、雄よりも雌で有意に高かったが、泌乳中と非泌乳中との間に差異は見られなかった。ついで、Tgマウスの血中において検出されたhGHが、どの組織から由来しているかを調べるために、乳腺と同様に外分泌機能を持つ顎下腺、膵臓及び脳組織をホモゲナイズして得た上清中のhGH量をRIAによって測定した。まず、両系統における各組織中のhGH量を比較してみると、顎下腺及び膵臓においてNo.3-1の系統に比べNo.8-1の系で高い値を示し、とくに、顎下腺において有意に高かった。これらの結果は、血中hGH量がNo.3-1系に比べNo.8-1系で高かった結果と良く一致した。一方、非泌乳中の乳腺では、他の2種類の組織に比べhGH量に大きな差異が見られなかった。つぎに、雌雄を比較してみると、顎下腺及び膵臓では、両系統において雌雄に差異は見られなかったが、乳腺では、雄に比べ雌が高かった。

ところで、Tgマウスの血中に内在マウスGH (15 ng/ml) よりも高いhGHが雌雄共に検出されたことから、Tgマウスにおいて何らかの生理的変化のあることが予想される。No. 3-1 及びNo. 8-1 の両系統の子孫において、生後6-7 週頃から雌雄共に肥満化がみられ、特に雌において顕著で不妊であった。これらのTgマウスを剖検して見ると、腹腔及び皮下に著しい脂肪の蓄積が観察された。つぎに、No. 8-1 系の雌の血中インスリン及びグルコース濃度を測定した結果、インスリン濃度は、対照のICR系マウスに比べ、不妊Tgマウスにおいて、約40倍もの高い値が得られ、また、血糖値も、約2.4 倍の値を示し、高血糖、高インスリン血症であることが判明した。このような生理的異常は、メタロチオネイン遺伝子のプロモーターとGHとの連結遺伝子が導入されたTg家畜においても観察されている。さらに、No. 8-1 系の不妊の雌について、下垂体、前葉、卵巣、膵臓、肝臓について組織学的な観察を行った。まず、下垂体重量は、ICR系のものに比べ約60%であった。つぎに、対照のICRマウスの前葉に比べ、好塩基性細胞、即ちGHやプロラクチン産生細胞の数並びに細胞容積が著しく減少していた。ヒトGHは、他の動物のGHと異なり、プロラクチン活性を有することが知られ、これらの事から、不妊Tgマウスにおいては、高い濃度の血中hGHの負のフィードバック作用により下垂体における内在性GH及びプロラクチンの産生が著しく抑制されているものと推察される。また、GTH産生細胞数についても幾分減少の傾向が観察された。さらに、卵巣の重量は、対照のICR系の卵巣と特に差異が見られなかったが、卵巣内実質の発達が悪く、また、卵胞発育に異常がみられ、黄体形成も不十分か全く観察されなかった。

以上のようなTgマウスの解析から、内在性のWAP遺伝子が乳腺以外の組織でもWAP遺伝子が発現している可能性が示唆された。そこで、内在WAP遺伝子がマウスの各種組織において、どのような発現様式を有しているかをRT-PCR法により調べた。まず、未經産及び分娩後10日目の泌乳中の雌マウスおよび成熟雄について、各組織におけるWAP遺伝子の発現について解析した結果、雄では、主に筋肉、腎臓、精巣でわずかな発現がみられ、精巣で最も高かった。これに対し、未經産の雌では、子宮、卵巣を含む解析したほぼ全ての組織でWAP遺伝子の発現が認められ、その発現量は雄の組織に比べかなり高かった。そこで、

妊娠、泌乳及び離乳各期における肝臓及び脳でのWAP遺伝子の発現について調べた。その結果、脳では、妊娠の6日目から、乳腺では妊娠16日目、さらに、肝臓では分娩後から、それぞれWAP遺伝子の発現が確認され、そのうち、脳及び肝臓での発現は、分娩後4日目と17日目にピークを示し、17日以後急速に減少し続け、離乳後9日目に妊娠前のレベルに復帰した。これらの両組織におけるWAP遺伝子の発現様式は、ほぼ乳腺でのそれと一致していることが認められた。これらの結果は、WAPが乳清蛋白質の一成分であるにとどまらず、各種器官で何らかの生理的役割を果たしている可能性を示唆している。

以上のことから、今後、目的に適ったTg動物を作出するためには、遺伝子発現の組織特異性に関する従来知見について、十分に再検討する必要があると考える。