

遺伝子導入家畜作出の問題点と今後の展開

農林水産省 畜産試験場
細胞操作研究室 今井 裕

近年の分子生物学の進展は著しいものがある。遺伝子工学技術の開発によって数多くの遺伝子が単離され、大腸菌、酵母さらに培養細胞に導入して発現させることも可能となった。さらに、この技術は過去10年の間に、遺伝子を細胞から個体レベルで発現させる技術として進展し、現在においても基礎生物学を中心として遺伝子機能解析の常套手段となっている。

哺乳動物の受精卵に遺伝子を導入して得られた個体は遺伝子導入（トランスジェニック）動物と呼ばれ、本来の遺伝形質に導入遺伝形質が新たに付加された個体が出る。この代表的な例が、1982年に作出された”スーパーマウス”であり、ヒト成長ホルモン遺伝子を導入することによって通常の約2倍の大きさに成長した。畜産産業領域から見れば、個体形質のこのような劇的変化と短期間での形質変換は、従来の家畜育種・改良法からは考えられないことである。まさに、畜産領域にとって、遺伝子導入技術は革新的な技術としてその期待は大きい。

遺伝子導入技術はすでにマウスでは確立されており、様々な遺伝子が組み込まれた遺伝子導入マウスが得られている。本講では、この技術の家畜に応用するに当たって現在どのような問題点があるのか、またこの種の手法が産業上どのような意味を持つのか、最近の内外の研究動向も含めて紹介したい。

1.家畜における遺伝子導入動物の作出の歴史と問題点

表1に、これまで家畜で行なわれた遺伝子導入動物作出の主要な報告をまとめて記した。家畜ではじめて遺伝子導入動物が作出されたのは1985年であるから、研究の歴史としては比較的新しい。家畜のなかでも最も多く利用されている動物種はブタである。その多産性に起因して、遺伝子導入卵子を数多く移植し、得られる産子も多いために必然的に遺

伝子導入動物の得られるチャンスが増すからである。

導入遺伝子としては成長ホルモン遺伝子が圧倒的に多い。”スーパーマウス”と同様の増体効果を家畜において期待したことを反映している。しかし、期待に反して成長ホルモン遺伝子の導入による増体効果は全く認められていない。

表 1 家畜における遺伝子導入動物の作出

Species	Gene	No. eggs injected	Offspring (%)	Integration (%)	Transgene expression (%)	Gen line transmission	Reference
Pig	MThGH	2035	192 (9)	20 (1.0)	11/18 (61)	5/6	Hammer et al (1985)
	MTbGH	2198	149 (7)	11 (0.5)	8/11 (73)	2/3	Pursel et al (1987)
	MTpGH	423	17 (4)	6 (1.4)	1/6 (17)	2/2	Vize et al (1988)
	MThGRF	2627	234 (9)	8 (0.3)	2/8 (25)	1/1	Pursel et al (1989)
	PRLbGH	289	23 (8)	4 (1.3)	2/4 (50)	4/4	Polge et al (1989)
	MLVrGH	170	15 (9)	1 (0.6)	1/1 (100)	-	Ebert et al (1988)
	ALBhGRF	968	132 (14)	5 (0.5)	3/3 (100)	-	Pursel et al (1989)
	PEPCKbGH	1057	124 (12)	7 (0.6)	5/7 (71)	1/3	Wiegart et al (1990)
Sheep	MThGH	1032	73 (9)	1 (0.1)	-	-	Hammer et al (1985)
	MTbGH	842	46 (6)	2 (0.2)	2/2 (100)	-	Hammer et al (1986)
	MToGH	436	27 (6)	1 (0.2)	0/1 (0)	-	Ward et al (1986)
	TFbGH	247	33 (13)	7 (2.8)	2/7 (29)	-	Rexroad et al (1988)
Cattle	MMTVbGH	250	14 (6)	1 (0.4)	-	-	Roshlau et al (1989)
	ASKhER	1704	16 (9)	1 (0.6)	0/1 (0)	-	Bondioli et al (1991)
Rabbit	RCAhIL2	932	74 (8)	8 (0.9)	1/1 (100)	8/8	Buhler et al (1990)

Gene constructs consisting of the regulatory region of MT (metallothionein), PRL (prolactin), MLV (Moloney murine leukemia virus), PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxylase), ALB (albumin), MMTV (mammary tumor virus), TF (transferrin), ASK (skeletal actin) or RCA (rabbit β -casein) fused to structural genes for GH (growth hormone), GRF (growth hormone releasing factor), ER (oestrogen receptor) or IL2 (interleukin 2) of h (human), p (pig), b (bovine), r (rat) or o (ovine) origin.

遺伝子導入卵子を移植すると、そのうちの約10%程度が産子として生まれてくる。しかし目的遺伝子が染色体に組み込まれた動物はこのうちの10%であって、遺伝子導入卵子から得られる遺伝子導入動物の全体的な効率率は1%以下にすぎない。さらに、導入遺伝子が動物内で確実に発現する保証はない。

家畜で遺伝子導入動物を作出する場合、マウスとは異質の問題が生ずる。表2にこれをまとめてみた。まず、遺伝子導入動物を作出するためには多くの受精卵を得ることが必要となる。このために、ホルモンによる過剰排卵処理を行なう。一般的には、多胎動物ほどこの処理によって多くの受精卵を得ることが出来る。しかし、家畜ではこのような処理の効果はブタやウサギだけで、それ以外のほとんどの家畜では遺伝子を導入するための卵子が十分に得られないという壁に突き当たる。

表2 家畜における遺伝子導入動物作出の実際と問題点

	マウス	ウサギ	ブタ	ヒツジ	ウシ
過剰排卵処理後の排卵数	20-30	30-50	15-20	5-10	4-5
遺伝子注入部位	明瞭	明瞭	不明瞭	明瞭	不明瞭
体外培養系	容易	可能	難	難	可能
移植可能胚数	10-15	10-15	4-20	2-4	1-4
産子数/1頭	8-12	6-9	4-12	1-2	1-2
動物数/遺伝子導入動物	5-8	15-30	20-90	500-1000	500-1000

家畜における遺伝子導入手法は唯一マイクロインジェクション法によって行われている。遺伝子導入効率は悪いが、現在最も確実な方法と言える。基本的にマウスのそれと全く同様に、受精直後の卵子の核内に顕微ガラスピペットによりDNA溶液を注入するものである。マウス、ウサギ、ヒツジ

等は遺伝子を導入する核が位相差・微分干渉顕微鏡下で容易に確認することが出来る。しかし、ブタやウシ等では卵子細胞質内に存在する黒い脂肪顆粒のために遺伝子導入部位を識別することは不可能で、遠心分離によって一時的に顆粒を偏在化する物理的操作を加える必要がある。また、遺伝子導入操作は体外の顕微鏡下で行なうために、受精卵を体外で操作し、一時的に体外で培養可能な培養系があることが望ましい。マウスの体外培養系はすでに確立されたものがあるが、家畜のそれは未だ開発途上である。

以上のことを考え、1頭の遺伝子導入動物を作出するために必要な動物数を現在の遺伝子導入効率から推定すると表2のようになり、ヒツジやウシでは数100頭レベルの動物が必要になる。家畜を飼育するための設備や規模およびそれに要する経費等を考えると我が国でこの種の研究を行なうことにはかなりの困難が伴う。従って、家畜における遺伝子導入動物作出に伴う第1の問題点は遺伝子導入効率の低さにあるとよい。

2.家畜で遺伝子導入動物を作出することの意義

家畜で遺伝子導入動物を作出する意義は、畜産領域では直接的には家畜の育種・改良である。成長ホルモン遺伝子を導入した家畜に増体効果が認められなかったように、一般的にpolygeneによって支配されている家畜の経済形質をこの手法によって改善するには、関連する遺伝子の機能解析や遺伝子単離技術に関する研究の進展が今後必要であろう。現時点では、家畜の遺伝子導入動物は畜産領域よりもむしろ医学領域においてより現実的な意義を持ちつつある。

遺伝子工学技術の進展によって、多くの遺伝子産物が大腸菌、酵母、哺乳動物や昆虫の培養細胞を利用して産生することが可能になっている。しかし、目的とする蛋白質のこれらの細胞での生産効率は低く、また糖鎖を含む複雑な蛋白質ではその生物活性に影響がでてくる場合が想定される。この点で、哺乳動物の乳腺は注目に値する。もし、家畜の乳腺に効率良く目的遺伝子産物を産出出来れば家畜乳に付加価値を与えることが可能となる。欧米ではすでに、プラスミノージェンアクティベーター、

血液凝固因子、トリプシンアクティベータ等医薬品として大きな市場価値のある蛋白質を家畜の乳汁中に分泌させることに成功しており、臨床応用の段階に至っている。表3には、家畜で行なわれた研究の一部を紹介している。目的蛋白質を乳汁中に発現させるために乳腺特異的に発現させる遺伝子調節領域を用いている点が特徴的であるが、導入遺伝子の発現量は導入する遺伝子の種類また用いた調節領域によって非常に変異がある。また、遺伝子産物の生物活性や医薬品として用いた場合の安全性等についての検討が今後の課題として残されている。

表3 家畜乳汁中への異種タンパク質の発現

Animal	Regulatory element	Introduced gene	Tissue specificity	Quantity product	Reference
Rabbit	Rb. β -cas	hIL2	M	430ng/ml	Buhler et al (1990)
Pig	WAP	WAP	M, S	lg/ml	Wall et al (1991)
Cattle	Bv. α -cas	hLF	?	?	Krimpenfort et al (1991)
Goat	WAP	hTPA	M, ?	6 μ g/ml	Ebert et al (1991)
Sheep	Ov. β -LG	h α 1AT	M, ?	35mg/ml	Wright et al (1991)

Cas: Casein; WAP: Way Acidic Protein; LG: Lactoglobulin

IL2: Interleukin-2; LF: Lactoferrin; TPA: Tissue Type Plasminogen Activator; α 1AT: α 1 Antitrypsin

M: Mammary Gland; S: Salivary Gland

これ以外にも、臓器移植や疾患モデル用の遺伝子導入動物としてブタやミニブタを利用して開発する試みが我が国でも開始されようとしている。

3. 遺伝子導入家畜作出に残された課題

すでに述べたように現在家畜で遺伝子導入動物を作出する場合の最も重要な問題点はその効率の低さである。導入した遺伝子の染色体への組み込みは全く受精卵任せであり、その導入位置も制御することは出来ない。結果的に、同一の遺伝子を用いて遺伝子導入動物を作出してもその

発現は動物毎に大きな変異がある。また、導入遺伝子が体組織でモザイクに存在することもまれではなく、このことは導入遺伝子形質の次世代への伝達に直接的に影響が及ぶ。従って、導入遺伝子の発現制御領域に関する理解は勿論のこと、この遺伝子をいかにして効率よく染色体内の目的とする部位に導入するかが今後の重要な課題となる。

この意味で、現在最も期待されているのが、ES細胞である。ES細胞は哺乳動物初期胚に由来する未分化細胞であり、1981年にマウスで初めて樹立された。一般の培養細胞と同様に体外で継代・維持が可能であり遺伝子導入操作が容易であると同時に、相同組み替え現象を利用した標的染色体部位への遺伝子導入が可能である。この細胞のもう一つの顕著な特徴は、その個体再構築能にある。ES細胞を正常胚に注入することによってキメラ動物が得られ、さらにES細胞は生殖細胞にも分化しうるために変異遺伝形質の次世代への伝達が可能である。現在、マウスではES細胞を用いた標的遺伝子組み替えによって様々な遺伝子の機能解析に多用されている。

ES細胞を利用した遺伝子導入動物の作出効率はマイクロインジェクション法の5-10倍高い。キメラ動物の作出効率を今以上に高めることが出来れば家畜に適用するうえで極めて有効な方法となる。さらに、核移植技術を用いたES細胞からの遺伝子導入動物のクローン化が可能となれば、この細胞の価値は今以上に高まる。残念ながら、マウス以外の動物種で生殖細胞に分化しうるES細胞株は未だに分離されていないが、家畜におけるES細胞株の分離は、畜産領域で現在最もホットな研究課題となっている。