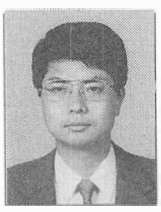
遺伝子工学的手法を用いた必須脂肪酸γ－リノレン酸の高等植物における多量生産

九州大学　理学部
射　場　　厚

Vegetative oils are of economic importance as human and animal foods and in many industrial applications. As the fatty acid compositions of most vegetative oils are not optimal for these uses, there is a broad interest in controlling the fatty acid compositions of higher plants. ω-3 fatty acid desaturase, which catalyzes the conversion of linoleic acid (18:2) to linolenic acid (18:3) in lipids, are located in the microsomes and plastid membranes. Transgenic tobacco plants were produced that express the transcripts of a tobacco microsomal ω-3 fatty acid desaturase gene (*NTFAD3*) in antisense and sense orientations under the control of the califlower mosaic virus 35S promoter. The antisense construct has the 0.5-kb fragment of the *NTFAD3* cDNA containing a 3'-flanking region and a part of the coding region in antisense orientation. The antisens-transformant lines showed decreases of the steady-state *NTFAD3* mRNA level to 30% of the control plants. In these lines, the 18:3 content decreased to about 80% in root tissues and to about 70-80% in leaf tissues when compared with the control plants. The sense construct has the 1.4-kb full-length cDNA of *NTFAD3*. In one of the sense-transformants lines, the 18:3 content increased by about 1.5-fold in root tissues and by about 1.1-fold in leaf tissues. These results indicate that the up- and down-regulation of the transcript level in the microsomal ω-3 fatty acid desaturase gene is useful to modify the 18:3 content in the vegetative tissues of higher plants.

1　緒　言

γ-リノレン酸は必須脂肪酸（ビタミンF）の一種として知られており、植物中に主として存在しているリノール酸がプロスタグランジン（PG）に転換する中間物質である。したがって、γ－リノレン酸は必須脂肪酸としての生理機能とともに、PG合成の前駆物質としてPGの持つさまざまな生理作用に関与している。一方、糖尿病、ガン、ウイルス感染、老化などは、プロスタグランジン前駆体の生合成経路において、その律速段階であるリノール酸からγ－リノレン酸に変える不飽和化酵素（Δ6脂肪酸不飽和化酵素）の活性を弱め、その結果、PG合成が抑制され、さらに健康障害が助長されると考えられている[1,2]。γ-リノレン酸の直接摂取は、このような状況の予防に役立つことが期待されるが、通常の植物から摂取される機会はほとんどない。現在、γ-リノレン酸は月見草種子から抽出された油脂として市販されているが、品種改良されて作られた月見草種子は海外の一部企業に独占され、生産量も少なく価格も高い。また、最近微生物（糸状菌）によるγ-リノレン酸の生産も行われているが、グルコースなどの炭素源に対する油脂生産の収率（対糖収率）は高だか30%で、1キログラムの油脂を作るのに3キログラムの原料が必要である。それゆえ、現在の糖質価格では、糖質からの油脂生産は大豆などの植物油にコスト面で太刀打ちできないのが現状である。本研究においては、高等植物におけるγ-リノレン酸生成のキーエンザイムであるΔ6脂肪酸不飽和化酵素遺伝子をクローニングするための研究技法の開発を行った。また、遺伝子工学的手法を用いて、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を高等植物に導入し、不飽和脂肪酸組成改変の可能性について検討した。



Modification of fatty acid composition by over and antisense-expression of a microsomal ω-3 fatty acid desaturase gene in transgenic tobacco

Koh Iba
Faculty of Science
Kyushu University

2 実　験

2.1 形質転換タバコの作製

Nicotiana tabacum cv. SR-1株をTi-プラスミドバイナリーベクターを持つ*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 を用いて、リーフディスク法により形質転換した[3]。Ti-プラスミドバイナリーベクターは、コントロールとしてpBI121、また図1に示すように、pBI121のT－DNA領域におけるカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流にタバコ小胞体局在型ω-3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子（*NTFAD3*）をセンス、アンチセンスの向きに挿入したコンストラクト（それぞれ、pTF1S、pTF1AS500）を用いた。再生したシュートから形質転換個体をカナマイシンにより選抜した。Primary transformants（R0）を自家受粉させ得られたR1種子を26℃において連続光照射下（3000lux）MS培地により発芽させた。

2.2 脂質脂肪酸の解析とノーザン解析

R1植物の葉組織に含まれる不飽和脂肪酸はガスクロマトグラフィー法により分析した[4]。

ノーザン解析用のRNA（トータルRNA）は、26℃で30日間生育させた幼苗から調製した。

2.3 ペプチド特異抗体の作製とウエスタンブロティングによる解析

ペプチドシンセサイザーを用いて合成した人工ペプチドを、架橋剤N-(ε-maiermidocaproyloxy) succinimideを用いてヘモシアニンに結合させた。ペプチドが結合したヘモシアニンは、セファデックスG-25を担体に用いたゲルクロマトグラフィーによって精製・濃縮した。この抗原にアジュバントを加え、ウサギ（ニュージーランドホワイト・オス・3kg）に注射した。抗原の接種後、2週間おきに3回続けてアジュバントを加えた抗原をさらに接種した。初回の接種後、1週間目から採血を行い、1晩室温で保存した血液を遠心分離によって血清を取り出し、フィルター滅菌の後、等量のグリセロールを加え－80℃で保存した。植物体に存在する脂肪酸不飽和化酵素タンパクと類似の構造を持つペプチドは、上記特異抗体を用いてウエスタンブロティング法により解析した。

3 結果と考察

3.1 ω-3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の導入による高等植物におけるα-リノレン酸含量の制御

ω-3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子は、小胞体膜と葉緑体膜にそれぞれ局在し、リノレン酸などのジエン脂肪酸からα-リノレン酸などのトリエン脂肪酸へ直接不飽和化する酵素である。一般に、高等植物においては、小胞体局在型酵素を*FAD3*遺伝子、葉緑体局在型を*FAD7*および*FAD8*遺伝子がそれぞれコードしている[5]。Tiプラスミドバイナリーベクター（pBI121）のT-DNA領域におけるカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流にタバコ小胞体局在型ω-3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子（*NTFAD3*）をセンス、アンチセンスの向きに挿入したコンストラクト（それぞれ、pTF1S、pTF1AS500）を作製し（Fig.1）、実験の項で述べたようにアグロバクテリムを介したリーフディスク法にタバコに導入した。pTF1AS500（アンチセンス）を導入した形質転換植物は26系統得られ、それぞれの脂肪酸組成を調べた結果、3系統（AS5、AS9、AS18）においてトリエン脂肪酸の著しい減少が観察された（Fig.2）。特に、AS5系統においては、18：3含量は根組織で6%、葉組織で14%の減少がみられた。一方、pTF1S（センス）を導入した形質転換植物は7系統得られ、そのうち4系統（S1，S7，S10，S14）において、トリエン脂肪酸の増加が観察された（Fig.3）。特に、S10系統においては、18：3含量は根組織において10%以上の増加が確認された。

これらのトリエン脂肪酸含量の変動と、導入された遺伝子の発現量との関係を調べるためにノーザン解析を行った（Fig.4）。センス形質転換植物

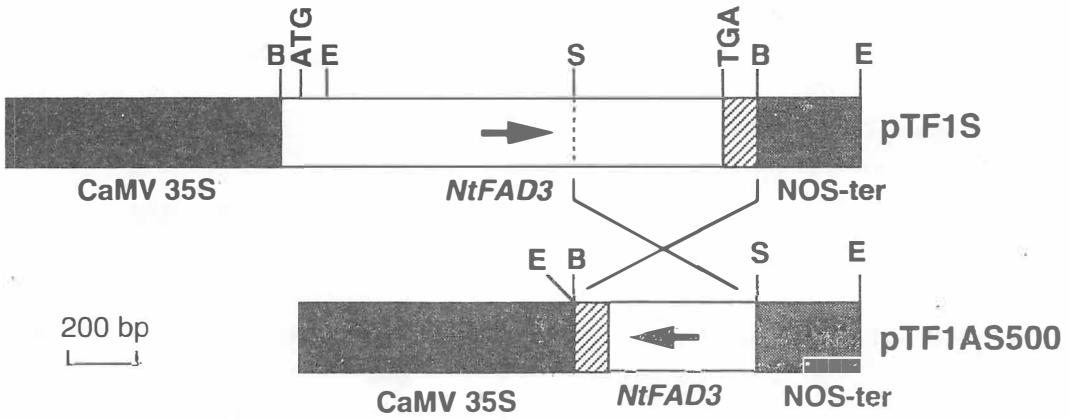


Fig.1 Structure of chimaeric genes for expression of *NTFAD3* in sense and antisense orientations. The sense construct, pTF1S, contains a full-length cDNA of *NTFAD3*. The antisense construct, pTF1AS500, contains a 0.5-kb fragment of the *NTFAD3* cDNA in antisense orientation behind the CaMV 35S promoter. The translation initiation codon (ATG) of the *NTFAD3* cDNA are shown, and the 3'-flanking regions are indicated by cross-hatching. Restriction sites shown are for BamHI (B), EcoRI (E) and SacII (S). NOS-ter indicates the terminator from the nopaline synthase gene.

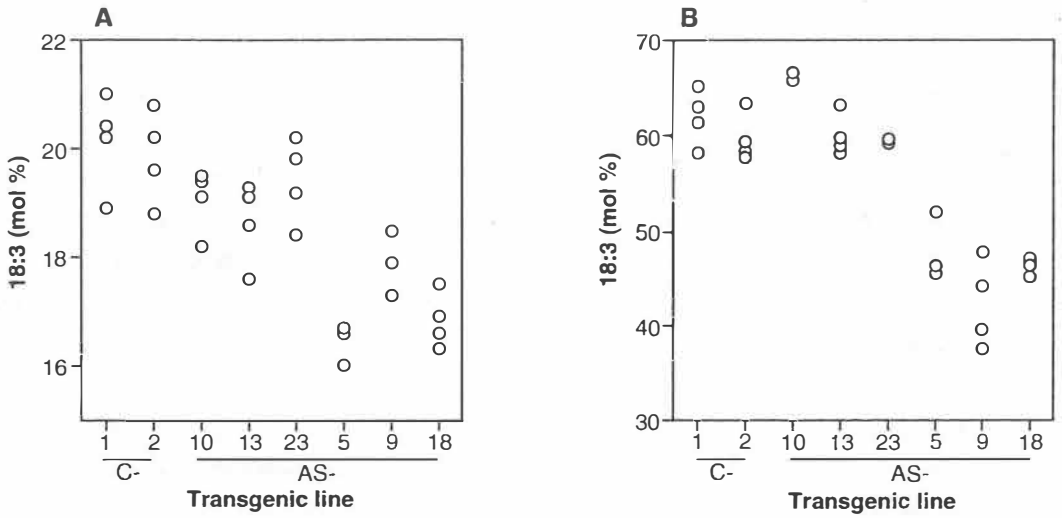


Fig.2 Contents of 18:3 in antisense transgenic plants with pTF1AS500. Contents of 18:3 in molar percentage of total fatty acids in whole roots (A) and in whole fourth leaves (B) of 30-day-old kanamycinresistant R1 seedlings of the antisense transgenic plants. Each open circle represents the 18:3 content of a single transformant (n=3 or 4). Control transformants with pBI121 (C1 and C2) are included for comparison.

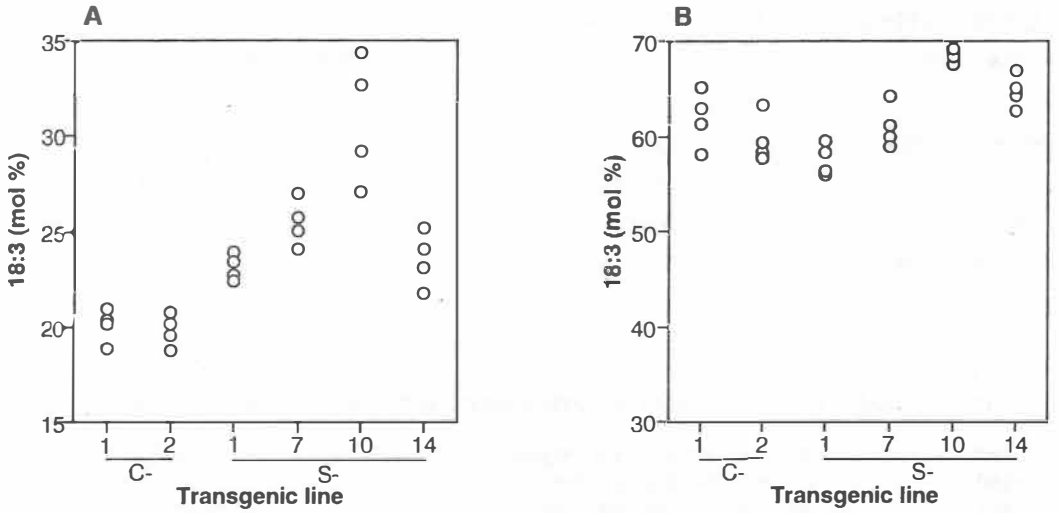


Fig. 3 Contents of 18:3 in sense transgenic plants with pRF1S. Contents of 18:3 in molar percentage of total fatty acids in whole roots (A) and in whole fourth leaves (B) of 30-day-old kanamycin-resistant R1 seedlings of the sense transgenic plants. Each open circle represents of the 18:3 content of a single transformatnt (n=3 or 4). Control transformants with pBI 121 (C1 and C2) are included for comparison.

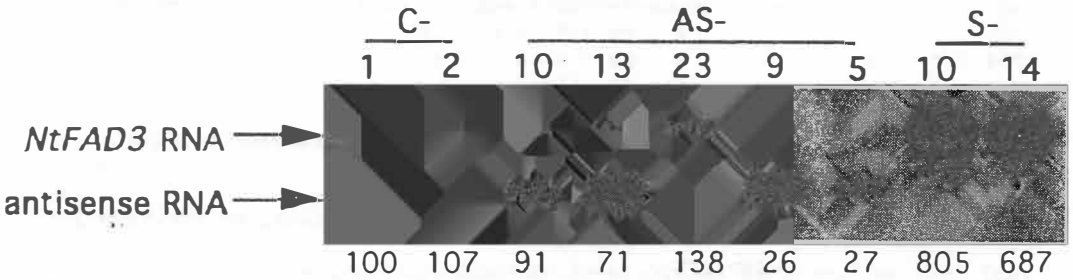


Fig. 4 RNA gel blot analysis of the *NTFAD3* cDNA. The transgenic line is shown above each lane. The steady-state level of the *NTFAD3* mRNA is given as a percentage of that in the control plant C1 below each lane.

体（S10とS14）においては、*NTFAD3* のmRNAレベルは、コントロール植物体と比べおよそ7-8倍の増加が見られた。一方、アンチセンス形質転換植物体で、特にトリエン脂肪酸含量の低下が著しい系統（AS5, AS9）においては、*NTFAD3* のmRNAの蓄積は殆ど見られなかった。これらの知見は、形質転換タバコにおけるトリエン脂肪酸レベルの増減を、内在性あるいは導入したω-3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現量を調節させることによって人為的に制御可能であることを示している。

3.2 脂肪酸不飽和化酵素に対するペプチド特異抗体の作製

シロイヌナズナからクローニングされたω-3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子（*FAD3, FAD7, FAD8*）およびラン藻からクローニングされたΔ12脂肪酸不飽和化酵素遺伝子（*DESA*）のDNA配列から推定されたアミノ酸配列を比較した結果、13アミノ酸残基中11アミノ酸が一致する領域を見い出した(Fig. 5)[6]。この配列は他の植物種からクローニングされた脂肪酸不飽和化酵素遺伝子においても保存されていた。このため、植物から原核生物であるラン藻まで多種の生物種にわたって、脂肪酸不飽和化酵素の機能に必須な共通領域であることが推定された。筆者らはこの領域において、N端側から10番目までのアミノ酸配列（FVLGHDCGHG）に対するペプチドをペプチドシンセサイザーを用

```
FAD7.   1  MANLVLSECGIRPLPRIYTTPRSNFLSNNNKFRPSLSSSSYKTSSSPLSFGLNSRDGFTR  60

FAD7.  61  NWALNVSTPLTTPIFEESPLEEDNKQRFDPGAPPPFNLADIRAAIPKHCWVKNPWKSLSY 120
FAD3.        1  MVVAMDQRSNVNGDSGARKEEG···S·Q···KIG·············S·LR·M··  55
ARG1.          1  MIQAQTLQHFGNGAREGDQSY·········KI···········E·STLR····  54
DESA.                1  MTATIP··TPTVTPSNPDRPIADLK·Q··IKTL··E·FE·KAS·AWAS  48

FAD7.121  VVRDVAIVFALAAGAAYLNNWIVWPLYWLAQGTMFWAIFVLGHDCGHGSFSNDPKLNSVV 180
FAD3. 56  ·T··IFA·A···MA·V·FDS·FL·····V····L···I·············DI·L····· 115
ARG1. 55  ·L···LV·T····S·ISF·S·FF·····P·····················SS····F· 114
DESA. 49  ·LITLGAIAVGYL·II··-P·YCL·IT·IWT··ALTGM··V·····R··AKKRWV·DL· 107

FAD7.181  GHLLHSSILVPYHGWRISHRTHHQNHGHVENDESWHPMSEKIYNTLDKPTRFFRFTLPLV 240
FAD3.116  ··I···F·····························V·LP··L·KN·PHS··ML·Y·V··P 175
ARG1.115  ··I···L·····N···················K····V·LT··V·KN··DM··ML·YSF·FP 174
DESA.108  ··IAFAPLIY·F·S··LL·DH··LHTNKI·V·NA·D·W·VEAFQASPAIV·L·YRAIRGP 167

FAD7.241  M-LAYPFYLWARSPGKKGSHYHPDSDLFLPKERKDVLTSTACWTAMAALLVCLNFTIGP- 298
FAD3.176  ·-····I···Y·····E···FN·Y·S··A·S···LIA···T··SI·L·T··Y·S·LVD·- 233
ARG1.175  I-F·······N·····E···FN·Y·N··S·G···G·V···L··GIVLSV·LY·SL····- 232
DESA.168  FWWTGSIFH·------SLM·FK--LSN·AQRD·NK·KL·I·V-VFLF·AIAFPALI·TTG 218

FAD7.299  I-QMLKLYGIPYWINVMWLDFVTYLHHHGHEDKLPWYRGKEWSYLRGGL-TTLDRDYGLI 356
FAD3.234  V-TV··V··V··I·F·····A·········DE·····················-··I·····IF 291
ARG1.233  ·-F·····V··L·F·············YTH·····Q·········-··V·····W· 290
DESA.219  VWGFV·FWLM·WLVYHF·MSTF·IV··TIP·IRF-R-PAAD··AAEAQ·NG·VHC··PRW 276

FAD7.357  NNIH-HDIGTHVIHHLFPQIPHYHLVEATEAAKPVLGKYYREPDKSGPLPLHLLEILAKS 415
FAD3.292  ····-·····I···········D··R···H···R·····KT··AI·I··V·S·VA· 350
ARG1.291  ··V·-·····KS··S·····Q·····F···KY·LQ· 349
DESA.277  VEVLC···NV·IP···SVA··S·N·RL·HGSL·ENW·PFLY·RTFNWQ·MQQISGQCHLY 336

FAD7.416  IKEDHYVSDEGEVVYYKADPNLYGEVKVRAD  446
FAD3.351  ··K·····T·DI·F·ET··D··VYASDKSKIN  383
ARG1.350  ·SQ··F···T·DI···QT··K·HQDSWTKSK  380
DESA.337  DP·HG·RTFGSLKKV  351
```

Fig. 5 Comparison of the deduced amino acid sequence of the protein encoded by *FAD* gene and related gene products. Identical amino acid residues are indicated by a dot, and spaces introduced to facilitate alignments are indicated by a dash. The *DESA* sequence encodes a D12 desaturase from Synechocystis PCC 6803. The ARG1 sequence is from an anonymous cDNA from mung bean. A region of very high sequence identity among all four proteins is boxed.

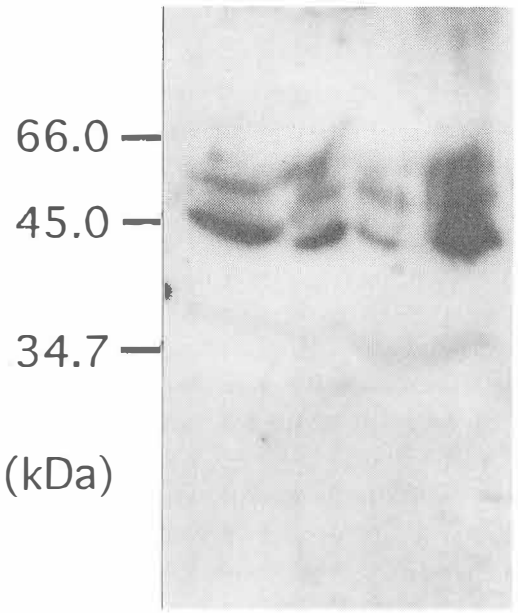


Fig.6 Identification of the ω-3 fatty acid desaturase and its homologuesin extracts of leaf tissues. Blots of total proteins from tobacco (left) and Arabidopsis(right)were probed with the peptide (GHDCGH) specific antibody.

いて作製し、実験の項に述べた方法によってペプチド特異抗体を作製した。シロイヌナズナ、タバコにおいて、ウエスタンブロッティング法によって、ω-3脂肪酸不飽和化酵素あるいはその類似ペプチドの存在を調べた（Fig.6)。その結果、これらの植物種において、同酵素に対応すると思われる50キロダルトンのペプチドの他に、およそ50～60キロダルトンの領域において複数のペプチドがこの特異抗体によって認識されることが分かった。現在、これらのペプチドの性質などについて、二次元電気泳動法などを用いて解析を行っているが、内在する他の脂肪酸不飽和化酵素に対応するペプチドを認識しているものと思われる。

5 総 括

本研究において、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の導入によって、形質転換植物におけるトリエン脂肪酸含量の増加が可能であることが明かにされた。また、脂肪酸不飽和化酵素のアミノ酸共通配列をもとに作製したペプチド特異抗体によって、植物に存在する複数の脂肪酸不飽和化酵素蛋白質を同定することが可能であることが示された。今後、月見草やボラージ草など、Δ6脂肪酸不飽和化酵素を持つと思われる植物種のcDNAライブラリーを作製し、ペプチド特異抗体を用いたスクリーニングによって、同酵素遺伝子のクローニングを試みたい。もし、この遺伝子がクローニングされれば、他の植物種への導入によってγ-リノレン酸の低コスト多量生産が実現すると思われる。

引用文献

1) 後藤浩樹：特定保健用食品素材としてのγ-リノレン酸、ジャパンフードサイエンス、1993－11, 60－65 1993

2) 長谷川昌康：γ-リノレン酸とその効用、New Food Industry、35 1－5 1993

3) Horsch R. B., Fly J. E., Hoffman N. L., Eichholtz D., Rogers S. G.,Fraley R. T.: A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227 1229-1231 1985

4) Lemieux B., Miquel M., Somerville C., Browse J.: Mutants of Arabidopsis with alterations in seed lipid fatty acid composition. *Theor. Appl. Genet.* 80 234-240 1990

5) Somerville C., Browse J.: Plant lipid: metabolism, mutants, and membranes. *Science*, 252 1071-1079 1982

6) Iba k., Gibson S. Nishiuchi T., Fuse T., Nishimura M., Arondel V., Hugly S., Somerville C.,:A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number

of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **268** 24099-24105 1993.