

とを目的とする。

本研究の趣旨から、いわゆる実験動物としての組換え体魚介類に関しては、この調査から除外する。ただし、現在は実験段階でも、水産食品対象物となり得る魚介類を扱っている研究は調査対象とした。

## B. 研究方法

遺伝子組換え魚に関する情報を文献データベースによる文献調査、インターネット、特許情報、新聞等を用いて調査した。

## C. 研究結果

### 1. 水産魚介類の組換え体作出の現状

魚類の組換え体作出に関する研究は1980年中頃から始まるようになった。はじめはマウスやウイルスなどのプロモーターの下流にレポーター遺伝子や他の動物の成長ホルモンcDNAをつなげたベクターを使用していたが、近年では魚由来のプロモーター、遺伝子が使用される傾向にある。

Dr. Rebecca Goldberg によってインターネット上で公開されている組換え魚介類を表1に示す。なお、この表には我々が調べた種も加えた。各種類に対応する論文として1から46までの論文を参考にあげた。論文番号が記入されていないのは、今回の調査で該当する論文が見つからなかった種類(アマゴ、Bluntnose bream、Gilthead bream、オオクチバス、Mud carp、Sea bream、Striped bass、Walleye)と、今回、調査対象としない実験動物として作出されたキンギョ、Killifish、メダカ、ゼブラフィッシュは参考論文を載せていない。

表1に記載された魚介類を利用方法によっ

て分類すると、次のようになる。

### 1) 実験動物として

キンギョ、Killifish、メダカ、Mummichog、ゼブラフィッシュ

### 2) 観賞魚として利用可能

キンギョ、ゼブラフィッシュ

### 3) 食品として利用可能

アワビ、大西洋サケ、Bluntnose bream、アメリカナマズ、マスノスケ、ギンザケ、コイ、Gilthead bream、オオクチバス、ドジョウ、Mud carp、Northern pike、カキ、Penaeid shrimp、ニジマス、Sea bream、Striped bass、ティラピア、Walleye

観賞魚として利用可能な種としてキンギョやゼブラフィッシュをあげたが、これらの種は現在の論文では実験動物として利用すると記入されていて、観賞魚として利用するといった論文ではない。また、食品として利用可能な種としてあげた論文でも、実験段階のレベルのものから、産業対象種として生産できるものまで多種多様である。

### 2. 組換え体を作成して期待される形質

水産魚介類で組換え体を作成して期待される効果としては次の3つが考えられる。

#### 1) 高成長(成長を早くする)

#### 2) 耐病性付与(病気にかかりにくくする)

#### 3) 肉質の改善

3の肉質の改善に関する研究はまだ無いといってよい。2の耐病性を付与する研究は始まったばかりであるが、報告がなされるようになってきた。表2として、このような研究の例を挙げる。

1の高成長に関する研究は魚類において多くの研究者が取り組んでいる研究である。

成長ホルモン遺伝子を組み込んだ研究はサケ・マス類、ティラピア、アメリカナマズ等で盛んに行われている。表3 サケ・マス類で行われた研究を示す (Devlin, 1997 の論文から改変)。

この表からもわかるとおり、研究当初はプロモーターにはウイルス由来のSV40 や CMV, RSV のプロモーターの下流にヒト、ラット、牛の成長ホルモン cDNA をつなげたプラスミッドを用いていた。1990年中頃から魚由来のプロモーター、ゲノム遺伝子に変わっていく傾向がわかる。サケ・マス類に成長ホルモン遺伝子を導入した組換え体の特徴はその成長促進効果がほかの動物やほかの魚と比べても強いことである (表4)。

### 3. 組換え体作出に関する情報

このように、成長ホルモン遺伝子を魚類に導入することで成長促進の効果が期待できることから、すでに民間機関によっても研究が進められている。もっとも研究が進み、また、実際に米国食品医薬品局(FDA)に食品として組換え体魚類を出荷する許可を申請中となっているのが A/F Protein 社という会社である。この会社に関する情報は次のインターネット上のホームページから参照可能である。

#### 1). A/F Protein 社ホームページ

<http://www.afprotein.com/>

#### 2). 実際に生産している現場 (同社が生産している組換え体大西洋サケに関する情報も掲載)

<http://www.aquabounty.com/>

#### 3). 同社がまとめた組換え体魚類に関する文献

<http://www.aquabounty.com/>

上記ホームページに入り reference の項

目をチェック

#### 4). A/F Protein 社が所属する会社

<http://www.genesis.mun.ca/>

[http://www.genesis.mun.ca/research/index.php?includefile=includes/af\\_protein.html&section=A/F%20Protein%20-%20Purified%20Gene%20and%20Growth%20Hormone](http://www.genesis.mun.ca/research/index.php?includefile=includes/af_protein.html&section=A/F%20Protein%20-%20Purified%20Gene%20and%20Growth%20Hormone)

一方、このような組換え体食品に対して懸念を表している関連ホームページも多数存在する。その中でもっとも組換え体魚類に関する情報が充実していると思われるホームページは下記の通りである。

#### 5). The center for food safety ホームページ

<http://www.centerforfoodsafety.org/genfish/index.html>

#### 4. 組換え体に関する特許情報

組換え体に関する特許状況をインターネットを用いて日本、アメリカ及びヨーロッパの特許の検索を行った。

日本においては組換え体に関する特許は検索できず、大手水産会社が成長ホルモン遺伝子関係のシーケンスに関する情報を特許として取得していた。

一方、ヨーロッパにおいては2001年に前述した Genesis 社が申請したサケ組み換え技術に関する特許を欧州連合特許局が承認したと新聞で報道された(2001年9月13日付、みなと新聞)。

アメリカにおいても組換え体魚類の作出に関する特許がいくつが承認されている。関連する特許を以下に示す。

#### 1) Isolation and Characterization of an

Actin Gene from Abalone  
U.S. Patent Number 5, 675, 061  
Powers et. al  
Oct. 7, 1997

2) Lycopene Cyclase Gene  
U.S. Patent Number 5, 792, 903  
Hirschberg et. al.  
August 11, 1998

3) Transgenic Salmonid Fish Expressing  
Exogenous Salmonid Growth Hormone  
U.S. Patent Number 5, 545, 808  
Hew et. al.  
August 13, 1996

4) Transgenic Fish and Vectors Therefor...  
U.S. Patent Number 5, 998, 697  
Devlin, Robert H.  
Dec. 7, 1999

5) Transgenic fish and a method of  
harvesting islet cells therefrom,  
US Patent 6, 015, 713  
Wright Jr. et. al.  
Jan. 18, 2000

これらのうち、A/F Protein 社が取得している特許が 3) の特許である。この特許を調べると受託者のひとつとして See-bright 社の名前があり、この会社が社名変更して Genesis 社となっている。A/F Protein 社はこのグループの一員である。

この特許情報によれば使用したプラスミッドの構成は ocean pout antifreeze promoter の下流にマスノスケ成長ホルモン cDNA をつなげ、これをプラスミッド pUC18 に挿入したものとある。これらのシーケンスに関する情報を下記に示す。

Ocean pout antifreeze protein gene sequence  
Genebank accession No. J03923, J03924  
Chinook salmon growth hormone gene sequence  
Genebank accession No. S50867

なお、A/F Protein 社の申請に対し FDA は未

だに許可を出していないと思われる。その根拠として FDA ホームページ上にアメリカにおいて組換え体動物は未だ許可されていないという情報が載っている。

アメリカ食品医薬品局ホームページ

<http://www.fda.gov/>

同獣医学センターホームページ

<http://www.fda.gov/cvm/>

同センターが消費者の組換え体魚類に関する質問に答えているページ

<http://www.fda.gov/cvm/index/consumer/transgen.htm>

5. 組換え体魚介類の研究を行っている国

組換え体に関する論文の著者から、かれらの所属する国を挙げると次のようになる。

アジア・オセアニア

韓国

中国

イスラエル

日本

インド

台湾

シンガポール

フィリッピン

ニュージーランド

ヨーロッパ

フランス

イギリス

フィンランド

スエーデン

スコットランド

ノルウェー

スペイン

ドイツ

南北アメリカ

アメリカ

カナダ

キューバ

## 6. その他

遺伝子組換え食品に一番近い動物としてサケ・マス類について詳細に調べた。しかし、実際はサケ・マス類以外にもティラピア、アメリカナマズでも実用化されつつあるのが現状である。

ティラピアに関しては発展途上国において重要な蛋白源となることからインドやバンラディッシュの研究者がイギリスと共同研究で成果を上げている。また、キューバにおいても成果が上がっていると思われるが、論文で報告される以外は情報に乏しい。1999年1月18日の読売新聞夕刊にキューバにおける遺伝子組み換えティラピアの紹介の記事が掲載され、その記事によるとボランティアを募り、試食している、と紹介されている。また、イギリスにおいてもティラピア組換え体の研究は進んでいる。彼らは自国で消費するためでなく、発展途上国に対する技術支援を目的に研究を行っている。

## D. 考察

魚類組換え体に関する研究は1990年中頃にはすでに完成しており、現在はその子孫を継代飼育している状況であると思われる。魚介類は一般に卵や精子の数が膨大で、一度、組換え体が作出されると次の世代に一度にたくさんの組換え体を生産できる。それ故に、最初に人が食べる可能性のある組み換え動物食品であろうといわれている。しかし、インターネッ

ト上の情報を見る限り、現状では組換え体魚類に対する姿勢はアメリカの消費者においても拒否感を示しているようである。1999年の記事でA/F Protein社が成長ホルモン遺伝子を組み込んだ大西洋サケを食品としてFDAに許可を申請中であったのに、3年後の2002年3月においても未だ許可されていない。

今すぐにも出荷できると報告している大西洋サケについて詳しく紹介してきたが、これ以外にもティラピア、アメリカナマズ等でもすでに組換え体の系統が確立している。これらの情報は論文以外にはインターネット上で断片的な情報を入手できるのみである。

## E. 結論

本研究によって次のことが明らかにされた。

- 1) 現在までに組換え体魚類は20数種で作出されている。
- 2) 魚類以外にも貝類、エビ類で組換え体が生産されている。
- 3) これらの研究は実験室レベルのものとして大量に飼育されているものがある。
- 4) アメリカにおいて、民間企業が組換え体大西洋サケを食品として利用する許可をFDAに申請中であるが、現段階で許可されていない。
- 5) 遺伝子組換え体ティラピアは発展途上国で技術が進んでおり、食品として利用されるのは、これらの国の方が早い可能性がある。しかし、これらの国の組換え体に関する情報は論文以外には乏しいのが現状である。

表1．現在までに作出されている組換え体魚介類

種 名	文 献
アワビ*	1
大西洋サケ*	2 -11
<b>Bluntnose bream*</b>	
アメリカナマス*	12-13
マスノスケ*	13
ギンザケ*	14-19
コイ*	20-23
<b>Gilthead bream*</b>	
キンギョ*	
<b>Killifish*</b>	
オオクチバス*	
ドジョウ*	24-26
メダカ*	
<b>Mud carp*</b>	
<b>Mummichog*</b>	
<b>Northern pike*</b>	27
<b>Penaeid shrimp*</b>	28-29
ニジマス*	30-32
<b>Sea bream*</b>	
<b>Striped bass*</b>	
ティラピア*	33-45
<b>Walleye*</b>	
ゼブラフィッシュ*	
カキ**	46
アマゴ**	

\*：下記インターネット上の情報による

[http://www2.environmentaldefense.org/documents/463\\_Something%20Fishy%2Ehtm](http://www2.environmentaldefense.org/documents/463_Something%20Fishy%2Ehtm)

\*\*：筆者による調査

表2 . 魚類における耐病性付与のための組換え体を利用したアプローチ

実験手法	原理	文献
antisense technology	The production of complementary RNA to complex with foreign or viral RNA	47
Ribozyme	The production of specific RNA -based enzyme to destroy foreign or viral RNA	47
Expression of viral coat protein	The expression of viral coat protein to occupy the receptor binding sites, thus competing with normal viral binding	
Expression antibacterial, antimicrobial substances and peptides	The expression of lysozyme and other cationic peptides to boost the host defense against a broad spectrum of pathogens	48 49

下記インターネット情報による情報を一部改変

<http://ci.mond.ort/9708/970812.html>

表3. サケ・マス類における成長ホルモン遺伝子導入結果

Species	Promoter/ enhancer		Transfer method	Retention(%)		Integration	Expression	Phenotype	Transmission (%)	Reference
	Coding region	method		Early <sup>a</sup>	Late <sup>b</sup>					
ニジマス	SV40	hGH cDNA/	m <sup>c</sup>	40.0(c) <sup>d</sup>						Chourrout et al., 1988
<i>Oncorhynchus</i>	mMT	rGH	m	3.7		SB <sup>f</sup>				Maclean et al., 1987
<i>mykiss</i>	SV40	hGH cDNA/	m		74.4	SB	-Protein	no growth stim.	F1: 8.2-28.8	Guyonard et al., 1989
	MHC-1 H2-K	hGH	m		46.2		-Protein	no growth stim.	F1: 16	
	mMT	hGH	m				-Protein	no growth stim.		
	mMT	rGH	m		37.5		-Protein	no growth stim.		
	SV40/MMTV	rGH	m				-Protein	no growth stim.		
	mMT	hGH	m		75.0	SB	+mRNA +Protein			Rokkones et al., 1989
	mMT	rGH	m		1.0(c)	SB				Penman et al., 1990
					0-18.0(0) <sup>e</sup>					
	mMT	bGH	inj. <sup>f</sup>		4.0					Chandler et al., 1990
	mMT	rGH	m		SB	SB	-Protein		F1: 0-81.0	Penman et al., 1991
										Maclean et al., 1992
	RSV	bGH cDNA/	ino. <sup>h</sup>		0.0					Chourrout and Perrot, 1992
	SV40	bGH cDNA	m			SB, PFGE <sup>i</sup>	-Protein		F2: ~50%	Tewari et al., 1992
						<i>In situ</i>				
	RSV/ohiocken	trout	m		8/10		+mRNA	1.12 x growth		Inoue et al., 1993
	$\beta$ -actin	GH1cDNA								
	opAFP	chinook GH1 cDNA	m		13.7			3.2 x growth		Devlin et al., 1995a
	sockeye MT-B	sockeye GH1	m		~10.0			~10 x growth		Devlin et al. (unpub.)
Cutthroat trout	opAFP	chinookGH1 cDNA	m					~10 x growth		Devlin et al., 1995a
<i>O. clarki</i>										
大西洋サケ	mMT	hGH	m		20.0	SB				Rokkones et al., 1988
<i>Salmo salar</i>	Atlantic GH1	Atlantic GH1	m		~5.0			+		Loren et al., 1990
	opAFP	chinook GH1 cDNA	m		1.9		-Protein	3-5 x growth		Du et al., 1992a
	sockeye MT-B	sockeye GH1	m		~2.0			~5 x growth		Devlin et al. (unpub.)
マスノスケ	opAFP	chinook GH1 cDNA	m		1.9			6.2 x growth		Devlin et al., 1995a
<i>O. tshawytscha</i>								acromegaly		
ギンザケ	opATP	chinook GH1 cDNA	m		3.9-4.7	SB	+Protein	3.6-10.7 x growth		Devlin et al., 1995a
<i>O. kisutch</i>								acromegaly		and unpub.
	opAFP	chinook GH1 cDNA					+Protein	embryonic growth,	F1: 0-18.9	Devlin et al., 1995b
								acromegaly		and unpub.
	sockeye MT-B	sockeye GH1	m		6.2		+Protein	11 x growth		Devlin et al., 1994
	sockeye MT-B	sockeye GH1	m			SB	+Protein	growth stim., acromegaly, reduced viability	F1: 2.8-12.2	Devlin et al. (unpub.)
	sockeye H3	sockeye GH1	m		5.0					Devlin et al. (unpub.)
	sockeye MT-B	chinook IGF-1	m		0.0					Devlin and Yesaki
	sockeye H3	chinook IGF-1	m		0.0					(unpub.)

Early:6ヶ月齢, Late:6ヶ月以上, m:マイクロインジェクション, (c):環状 DNA, (0):一本鎖 DNA, SB:サザンブロットによる確認, inj.:33ゲージの注射針によるインジェクション,

ino:インキュベート, i:パルスフィールド電気泳動法, i:細胞質に存在,

m=マウス, h=ヒト, r=ラット, b=ウシ

Devlin, R. H. (1997)の論文データを改変

表4 . 成長ホルモン遺伝子を組み込んだ組換え体動物における成長促進効果の比較

Mouse	mMT	rGH gene	~2	Palmiter et al., 1982
Pig	mMT	bGH gene	1.11	Pursel et al., 1989
Salmonids	opAFP	chinook cDNA	3-10.7	Devlin et al., 1995
	sockeye MT-B or H3	sockeye GH1	6-11	Devlin et al., 1994
Loach	mMT	hGH gene	2	Zhu et al., 1986
	mMT	hGH gene	+	Enikolopov et al., 1989
	opAFP	chinook GH1 cDNA	2.5	Tsai et al., 1995
Common carp	mMT	hGH gene	1.09	Zhu et al., 1992
	RSV	rtGH1 cDNA	1.21-1.4	Zhang et al., 1990
	RSV	rtGH1 cDNA	0.73-1.4	Chen et al., 1993
	mMT	hGH gene	+	Wu e al., 1994
Crucian carp	mMT	hGH gene	1.78	Zhu et al., 1992
Catfish	RSV	coho GH cDNA	1.26	Dunham et al., 1992
Pike	RSV	bGH cDNA	0-1.2	Gross et al., 1992
Medaka	chicken $\beta$ -actin	hGH gene	1.2-1.53	Lu et al., 1992
	mMT	hGH gene	~1.46	Lu et al., 1992
Zebrafish	RSV	coho GH cDNA	1.7	Zhao et al., 1993
	mMT	rGH	+/-	Pandian et al., 1991
Tilapia	CMV	tilapia GH cDNA	1.82	Martinez et al., 1996

by Devlin(1977)

## 参考文献

組換え体作出・生物特性に関する論文（主に最近の論文から）

1. Gomez-Chiarri, M. *et al.* (1999) Isolation and characterization of an actin promoter from the red abalone (*Haliotis rufescens*). *Marine biotechnology* 1(3), 269-278
2. Cook, J.T. *et al.* (2000) Growth rate, body composition and feed digestibility / conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 188(1-2), 15-32
3. Cook, J. T., *et al.* (2000) Metabolic rate of pre-smolt growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 188(1-2), 33-45
4. Cook, J.T. *et al.* (2000) Effect of food deprivation on oxygen consumption and body composition of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 188(1-2), 47-63
5. Stevens, E. D. and Devlin, R. H. (2000) Gill morphometry in growth hormone transgenic pacific coho salmon, *Onchorhynchus kisutch*, differs markedly from that in GH transgenic Atlantic salmon. *Environmental biology of fishes* 58(1), 113-117
6. Hew, C. *et al.* (1999) Liver-specific and seasonal expression of transgenic Atlantic salmon harboring the winter flounder antifreeze protein gene. *Transgenic research* 8(6), 405-414
7. Abrahams, M. V. and Sutterlin, A. (1999) The foraging and antipredator behaviour of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon. *Animal behavior* 58, 933-942
8. Stevens, E. D. *et al.* (1999) Gut morphology in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Journal of fish biology* 55(3), 517-526
9. Stevens, E. D. and Sutterlin, A. (1999) Gill morphometry in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Environmental biology of fishes* 54(4), 405-411
10. Sauders, R. L. *et al.* (1998) Smolt development in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Aquaculture* 168(1-4), 177-193
11. Stevens, E. D. *et al.* (1998) Respiratory metabolism and swimming performance in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 55(9), 2028-2035
12. Dunham, R. A. *et al.* (1999) Predator avoidance of transgenic channel catfish containing salmonid growth hormone genes. *Marine biotechnology* 1(6), 545-551
13. Sin, F. Y. T. *et al.* (1993) Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by electroporating sperm in the presence. *Aquaculture* 117(1-2), 57-69
14. Dunham, R. A. and Devlin, R. H. (1999) Comparison of traditional breeding and transgenesis in farmed fish with implications for growth enhancement and fitness.

- Transgenic animals in agriculture, 209-229.
15. Devlin, R. H. *et al.* (2000) Seawater adaptability and hormone levels in growth-enhanced transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture* 191(4), 367-385
  16. Hill, J. A. *et al.* (2000) Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) transgenic for growth hormone gene construct exhibit increased rates of muscle hyperplasia and detectable levels of differential gene expression. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 57(5), 939-950
  17. Stevens, E. D. and Devlin, R. H. (2000) Intestinal morphology in growth hormone transgenic coho salmon, *Journal of fish biology* 56(1), 191-198
  18. Devlin, R. H. *et al.* (1999) Increased ability to compete for food by growth hormone-transgenic coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *Aquaculture research* 30(7), 479-482
  19. Stevens, E. D. and Devlin, R. H. (2000) Gill morphometry in growth hormone transgenic Pacific coho salmon, *Onchorhynchus kisutch*, differs markedly from that in GH transgenic Atlantic salmon. *Environmental biology of fishes* 58(1), 113-117
  20. Zeng, Z. Q. and Zhu, Z. Y. (2001) Transgenes in F-4 pMThGH-transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.) are highly polymorphic. *Chinese science bulletin* 47(2), 143-148
  21. Fu, C. H. *et al.* (2000) Whole-body amino acid pattern of F-4 human growth hormone gene-transgenic red common carp (*Cyprinus carpio*) fed diets with different protein levels. *Aquaculture* 189(3-4)
  22. Hinitz, Y. and Moav, B. (1999) Growth performance studies in transgenic *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 173(1-4), 285-296
  23. Fu, C. *et al.* (1998) Growth and feed utilization by F-4 human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. *Journal of fish biology* 53(1), 115-129
  24. Nam, Y. K. *et al.* (2001) Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic research* 10(4), 353-362
  25. Nam, Y. K. *et al.* (1999) Transmission and expression of an integrated reporter construct in three generations of transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Aquaculture* 172(3-4), 229-245
  26. Nam, Y. K. (2000) Isogenic transgenic homozygous fish induced by artificial parthenogenesis. *Transgenic research* 9(6), 463-469
  27. Gross, M. L. *et al.* (1992) Molecular analysis and growth evaluation of northern pike *Esox-lucius* microinjected with growth hormone genes. *Aquaculture* 103(3-4)
  28. Tseng, F. S. *et al.* (2000) Introducing foreign DNA into tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

- by electroporation. *Theriogenology* 54(9), 1421-1432
29. Li, S. S. and Tsai, H. J. (2000) Transfer of foreign gene to giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) by spermatophore-microinfection. *Molecular reproduction and development* 56(2), 149-154
  30. Uzbekova, S. *et al.* (2000) Transgenic rainbow trout expressed sGnRH-antisense RNA under control of sGnRH promoter of Atlantic salmon. *Journal of molecular endocrinology* 25(3), 337-350
  31. Yoshizaki, G. *et al.* (2000) Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter. *International journal of developmental biology* 44(3), 32-326
  32. Takeuchi, Y. *et al.* (1999) Green fluorescent protein as a cell-labeling tool and a reporter of gene expression in transgenic rainbow trout. *Marine biotechnology*, 1(5), 448-457, 1999.
  33. Rahman, M. A. *et al.* (2001) Growth and nutritional trials on transgenic Nile tilapia containing an exogenous fish growth hormone gene. *Journal of fish biology* 59(1), 62-78
  34. Rahman, M. A. *et al.* (2000) Copy number related transgene expression and mosaic somatic expression in hemizygous and homozygous transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic research* 9(6), 417-427
  35. Martinez, R. *et al.* (2000) Growth efficiency in transgenic tilapia (*Oreochromis sp.*) carrying a single copy of an homologous cDNA growth hormone. *Biochemical and biophysical research communications* 267(1), 466-472
  36. Razak, S. A. *et al.* (1999) Growth performance and gonadal development of growth enhanced transgenic tilapia *Oreochromis niloticus*(L.) following heat-shock-induced triploidy. *Marine biotechnology* 1(6), 533-544
  37. Guillenn, I. *et al.* (1999) Safety evaluation of transgenic tilapia with accelerated growth. *Marine biotechnology* 1(1), 2-14
  38. Martinez, R. *et al.* (1999) Mendelian transmission, transgene dosage and growth phenotype in transgenic tilapia (*Oreochromis homorum*) showing ectopic expression of homologous growth hormone. *Aquaculture* 173(1-4), 271-283
  39. Rahman, M. A. and Maclean, N. (1999) Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene. *Aquaculture* 173(1-4), 333-346
  40. Rahman, M. A. *et al.* (1998) Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic research* 7(5), 357-369
  41. Rahman, A. and Maclean, N. (1998) Production of lines of growth enhanced transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) expressing an novel piscine growth hormone gene. *New*

developments in marine biotechnology 19-28

42. Rahman, M. A. *et al.* (1997) Co-injection strategy improves integration efficiency of a growth hormone gene construct, resulting in lines of transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) expressing an exogenous growth hormone gene. *Transgenic research* 6(6), 369-378
43. Hernandez, O. *et al.* (1997) Characterization of transgenic tilapia lines with different ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular marine biology and biotechnology* 6(4), 364-375
44. Hernandez, O. *et al.* (1997) Characterization of transgenic tilapia lines with different ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular marine biology and biotechnology* 6(4), 364-375
45. de la Fuente *et al.* (1999) Growth regulation and enhancement in tilapia basic research findings and their applications. *Genetic analysis-bimolecular engineering* 15(3-5), 85-90
46. Buchanan, J. T. *et al.* (2001) Transfection of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) embryos. *Marine biotechnology* 3(4), 322-335

#### 耐病性付与に関する論文

47. Hackett, P. B. (1993) The molecular biology of transgenic biochemistry and molecular biology of fishes. *Molecular biology frontiers*. Elsevier, Amsterdam, Vol. 2, pp. 207-240
48. Hew, C.L. *et al.* (1995) Transgenic salmon: tailoring the genome for food production. *Journal of Fish Biology* 47 (Supplement A) 1-19
49. Jia, X. *et al.* (2000) Antimicrobial peptides protect coho salmon from *Vibrio anguillarum* infections. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(5), 1928-1932

#### 組換え体魚類に関するレビュー

50. Maclean, N. and Penman, D. (1990) The application of gene manipulation to aquaculture. *Aquaculture* 85, 1-20
51. Chen, T. and Powers, D. A. (1990) Transgenic fish. *Trends in biotechnology* 8, 209-215
52. Houdebine, L. M. and Chourrout, D. (1991) Transgenesis in fish. *Experientia* 47, 891-897
53. Fletcher, G. and Davies, P. L. (1991) Transgenic fish for aquaculture. *Genetic engineering* 13, 331-369
54. Hackett, P. B. (1993) The molecular biology of transgenic biochemistry and molecular biology of fishes. *Molecular biology frontiers*. Elsevier, Amsterdam, Vol. 2, pp. 207-240
55. Pandian, T. J., and Marian, L. A. (1994) Problems and prospects of transgenic fish production. *Current science* 66, 635-649

56. Gong, Z. and Hew, C. L. (1995) Transgenic fish in aquaculture and developmental biology. In R. A. Pederson and G. P. Schatten (eds.), Current topics in developmental biology. Academic press, San diego, CA, Vol.30, pp. 175-214
57. Devlin, R. H. (1977) Transgenic salmonids. In L. M. Houdebine (eds.), Transgenic animals, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 105-115

参考インターネットホームページ

1. Dr. Rebecca Goldberg による組換え体魚介類作出の現状を紹介したホームページ  
[http://www2.environmentaldefense.org/documents/463\\_Something%20Fishy%2Ehtm](http://www2.environmentaldefense.org/documents/463_Something%20Fishy%2Ehtm)
2. A/F Protein 社の組換え体サケを紹介した記事 (上) (WIRED NEWS 日本訳)  
<http://www.hotwired.co.jp/news/news/Technology/story/3091.html>
3. A/F Protein 社の組換え体サケを紹介した記事 (下) (WIRED NEWS 日本訳)  
<http://www.hotwired.co.jp/news/news/Technology/story/3100.html>
4. 上記2, 3 の原文記事  
<http://www.wired.com/news/technology/0,1282,21831,00.html>(原文)
5. A/F Protein 社ホームページ  
<http://www.afprotein.com/>
6. 実際に生産している現場 (組換え体大西洋サケに関する情報も掲載)  
<http://www.aquabounty.com/>
7. 同社がまとめた組換え体魚類に関する文献  
<http://www.aquabounty.com/>  
上記ホームページに入り reference の項目をチェック
8. A/F Protein 社が所属する会社 (Genesis group)  
<http://www.genesis.mun.ca/>  
[http://www.genesis.mun.ca/research/index.php?includefile=includes/af\\_protein.html&section=A/F%20Protein%20-%20Purified%20Gene%20and%20Growth%20Hormone](http://www.genesis.mun.ca/research/index.php?includefile=includes/af_protein.html&section=A/F%20Protein%20-%20Purified%20Gene%20and%20Growth%20Hormone)
9. The center for food safety ホームページ  
<http://www.centerforfoodsafety.org/gefish/index.html>
10. 組換え体特許情報  
[Isolation and Characterization of an Actin Gene from Abalone](#)  
U.S. Patent Number 5,675,061  
Powers et. Al  
Oct. 7, 1997

Lycopene Cyclase Gene  
U.S. Patent Number 5,792,903  
Hirschberg et. al.  
August 11, 1998

Transgenic Salmonid Fish Expressing Exogenous Salmonid Growth Hormone  
U.S. Patent Number 5,545,808  
Hew et. al.  
August 13, 1996

Transgenic Fish and Vectors Therefor...  
U.S. Patent Number 5,998,697  
Devlin, Robert H.  
Dec. 7, 1999

Transgenic fish and a method of harvesting islet cells therefrom,  
US Patent 6,015,713  
Wright Jr. et. al.  
Jan. 18, 2000

11. アメリカ食品医薬品局ホームページ

<http://www.fda.gov/>

12. 同獣医学センターホームページ

<http://www.fda.gov/cvm/>

13. 同センターが消費者の組換え体魚類に関する質問に答えているページ

<http://www.fda.gov/cvm/index/consumer/transgen.htm>

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
（分担研究報告書）

安全性評価に関する研究（1）  
導入遺伝子の後代における発現の安定性  
分担研究者 鎌田博 筑波大学生物科学系教授

研究要旨

昨年度、輸入ダイズに含まれていた遺伝子組換えダイズについて、ELISA 法によって EPSPS タンパク質の発現を調査し、後代における導入遺伝子の発現の安定性を検討したところ、PCR によって *epsps* 遺伝子が検出されても、ELISA によって EPSPS タンパク質が検出されない個体が見つかった。この個体に導入されている *epsps* 遺伝子を解析したところ、*epsps* 遺伝子の終端部分が欠損していることが明らかになった。この欠損は、相同組換えによってゲノム上の他の部分と置き換わった結果と考えられる。

協力研究者

佐々木和生、梅津博紀（青森大学工学部）  
小関良宏（東京農工大工学部）  
小野道之（筑波大学遺伝子実験センター）  
日野明寛、松岡猛（農水省食総研）

A. 研究目的

遺伝子組換え農作物およびそれらを利用して作出された加工食品の検知法については、食品衛生法および JAS 法の下に遺伝子組換えの表示が義務付けられたことにより、厚生労働省および農林水産省が、それぞれ検知の公定法を定めるに至った。我々は、公定法を踏まえた方法で、昨年度までに、除草剤耐性遺伝子を導入した組換えダイズや害虫抵抗性・除草剤耐性遺伝子を導入したトウモロコシを用い、PCR 法による遺伝子の検知と、ELISA 法による発現タンパク質の検知を同じ個体に対して行い、後代における導入遺伝子のタンパク質レベルでの安定性を調査した。本年度は、昨年度見つかったタンパク質の発現が認められなかった個体について、導入されている *epsps* 遺伝子の解析を行った。さらに、このような事例の出現頻度を調査する目的で、PCR 法によって *epsps* 遺伝子が検知されたダイズ個体について、ELISA 法による発現タンパク質の検知を行った。

B. 研究方法

<試料>

輸入ダイズは、モニタリング用に一昨年度検疫所より供与されたものを用いた。

<方法>

ダイズからの DNA 抽出

一昨年本分担研究者らによって開発された改変 CTAB 法によって DNA 抽出を行った。PCR

PCR 反応液は、1×PCR 緩衝液(宝酒造(株))、0.2mM dNTP、0.2μl プライマーおよび 1unit Taq DNA ポリメラーゼを含む液に、DNA 溶液 1μl を加え、全量を 25μl にした。ダイズの導入遺伝子の増幅は、95℃に 5 分間保った後、95℃で 30 秒間、57℃で 30 秒間、74℃で 1 分間に設定し、30 サイクルの増幅反応を行った後、74℃で 5 分間終了反応を行った。トウモロコシの導入遺伝子の増幅は、95℃に 3 分間保った後、95℃で 30 秒間、62℃で 30 秒間、74℃で 30 秒間に設定し、45 サイクル

の増幅反応を行った後、74℃で5分間終了反応を行った。

PCRのプライマーは、Yamaguchi *et al.* (2000)に報告されているプライマーを用いた(図1、35S, E3'-206)。

#### 電気泳動

PCR反応液5 $\mu$ lを1.5%のアガロースゲルにアプライし、100Vの電圧下TAE緩衝液で約30分間泳動を行った。次いで、ゲルをエチジウムブロマイド溶液で10分間処理し、青色LED(470nm)によって励起されたPCR増幅バンドを、CCDカメラを用いて撮影した。

#### PCR増幅産物のクローニングとシークエンス

PCRによる増幅産物のクローニングは、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いた。クローニングしたPCR産物のシークエンスは、オートシークエンサー(Gene Rapid, アマシャムファルマシアバイオテック(株)、東京)を用いて行った。

#### ELISA法によるタンパク質の検出

Strategic Diagnostics Inc. (Newark, DE, USA)製を用いた。

### C. 結果・考察

#### C.1. 発現タンパク質が検出されない遺伝子組換えダイズの導入遺伝子の解析

昨年度発見されたELISA法によって発現タンパク質が検出されなかった遺伝子組換え個体(表1、No. 12)について、再度PCRによって*epsps*遺伝子の確認を行ったところ、513bpの増幅断片が認められた(図2a)。さらに、この増幅断片をクローニングし、塩基配列を決定したところ、増幅された全領域において塩基配列に変化は無かった(図2b)。

PCRによる検知に用いられているプライマーサイトは、導入遺伝子のプロモーター領域からプラスチド移行配列と構造遺伝子206bpを含む部分である(図1、A)。このことから、構造遺伝子のさらに下流からターミネーターまでの部分を増幅するようなプライマーを設計し(図1、E5'-450, NOS)、PCRを行った。その結果、発現タンパク質が検出されたNo. 7およびNo. 8では増幅断片

が検出されたが、発現タンパク質が検出されなかったNo. 12の個体においては増幅断片が検出されなかった(図3)。このことより、No. 12の個体では、この増幅領域(図1、B)のどこかに変化が生じていると考えられた。そこで、この領域を部分的に増幅するプライマーを設計し(図1、E5'-31, E3'-669, -921, -1154)、それぞれを用いてPCRを行った。その結果、構造遺伝子の1154までの領域ではPCRによって増幅断片が確認され(図4)、1154までの領域では変化が起こっていないと考えられた。さらに下流にプライマーを設計し(図1、E3'-1266, -1368)、PCRを行ったところ、1266までの増幅断片が得られたが、1368までの増幅断片が得られなかった(図5)。このことから、1266から終止コドンに至る約100bpの間に変化が生じていると考えられた。このことは、相同組換えにより、ゲノム上の他の部分と置換していることによると考えられるため、現在、*epsps*遺伝子上の置換部位の特定を行っている。

#### C.2. 輸入組換えダイズにおけるEPSPSタンパク質の発現の検討

C.1.に示された事例が起こる頻度を調査する目的で、平成11年度に輸入されたダイズからゲノムDNAとタンパク質を抽出し、PCR法による導入遺伝子の検知とELISA法による発現タンパク質の検知を行った。昨年度までのモニタリング調査により、組換えダイズの混入率の高かったロットより任意に60個の穀粒を選抜して播種した。発芽した49個体中、PCRによって*epsps*遺伝子が検知されたダイズは40個体であった。この40個体について、ELISA法によるタンパク質の検出を行ったところ、36個体においてはタンパク質が検出され、4個体ではEPSPSタンパク質は検出されなかった。現在、これら4個体中に存在する導入遺伝子をC.1.と同様に解析している。

#### C.3. マイクロアレイを用いた発現解析

導入された外来遺伝子の機能(転写調節因子等)によっては、宿主(親)植物の内在性遺伝子の発現が大幅に変更することが考えられる。そこで、最近開発されたマイクロア

レーを用い、ゲノム全体の遺伝子の発現変動を網羅的に検索する方法を検討することを計画した。昨年度は、米国で受託による解析が行われていたシロイヌナズナのマイクロアレーを用い、異種植物の発現解析が可能か否かを調査し、一定程度の発現変動を解析することが可能であることを明らかにした。そこで、本年度は、実際に遺伝子組換えトウモロコシや遺伝子組換えダイズでマイクロアレー解析を実行する予定であったが、昨年秋に急に受託解析が中止となってしまった。そこで、我が国で進行中のシロイヌナズナマイクロアレーコンソーシアムを活用し、本研究に供試できるマイクロアレープレートの作成を進めた。ごく最近になり、使用可能なシロイヌナズナマイクロアレープレートがやっと作成できたため、できる限り早い時期にマイクロアレー解析を実施する予定である。

#### D. 研究発表

(論文発表)

鎌田博 遺伝子組換え食品の安全性. 現代化学, 10; 16-23 (2001)

鎌田博 序にかえて - 遺伝子組換え実験の歴史と安全性確保 -. 遺伝, 55(6); 24-28 (3001)

鎌田博 遺伝子組換え作物の食品としての安全性. 遺伝, 55(6); 46-52 (2001)

鎌田博 遺伝子組換え植物の安全性研究の現状と展望. 研究ジャーナル, 24(4); 5-12 (2001)

(学会発表)

佐々木和生、野口昌敬、小関良宏、梅津博紀、鎌田博 「除草剤耐性ダイズにおける導入組換え遺伝子の発現について」 日本食品化学学会第7回学術大会、岡山、2001年5月。

鎌田博 「遺伝子組換え植物の育成と食品としての安全性評価の考え方」 第55回日本栄養・食糧学会大会・シンポジウム、京都、2001年5月。

野口昌敬、山口秀明、梅津博紀、佐々木和生、小関良宏、鎌田博 「遺伝子組換えダイズの後代における導入遺伝子の発現について」 日本植物細胞分子生物学会第19回大会、東京、2001年7月。

山口秀明、佐々木和生、松岡猛、日野明寛、梅津博紀、鎌田博 「遺伝子組換えトウモロコシの検知およびモニタリング」 日本植物細胞分子生物学会第19回大会、東京、2001年7月。

H. Yamaguchi, K. Sasaki, H. Umetsu and H. Kamada 「Comparison of detecting methods of genetically modified maize and the state of its import into Japan」 6<sup>th</sup> French-Japanese Workshop in Plant Molecular Biology, Prades (France), 2001年10月。

表1 ダイズ抽出液中のタンパク質量とELISAの結果

No.	EPSPS タンパク質		No.	EPSPS タンパク質	
	Protein conc. (mg/ml)	+		Protein conc. (mg/ml)	+
1	8.3	+	27	11.9	+
2	8.5	+	28	12.0	+
3	8.7	+	29	12.1	+
4	8.8	+	30	12.1	+
5	9.0	+	31	12.1	+
6	9.2	+	32	12.2	+
7	9.9	+	33	12.3	+
8	10.4	+	34	12.6	+
9	10.4	+	35	12.8	+
10	10.5	+	36	12.9	+
11	10.6	+	37	13.2	+
12	10.7	-	38	13.5	+
13	10.7	+	39	13.9	+
14	10.7	+	40	14.1	+
15	10.7	+	41	14.2	+
16	10.8	+	42	14.2	+
17	11.2	+	43	14.8	+
18	11.3	+	44	14.9	+
19	11.3	+	45	15.0	+
20	11.3	+	46	15.4	+
21	11.4	+	47	15.9	+
22	11.5	+	48	16.6	+
23	11.6	+	49	16.8	+
24	11.7	+	50	16.9	+
25	11.8	+	51	17.6	+
26	11.8	+	52	19.0	+

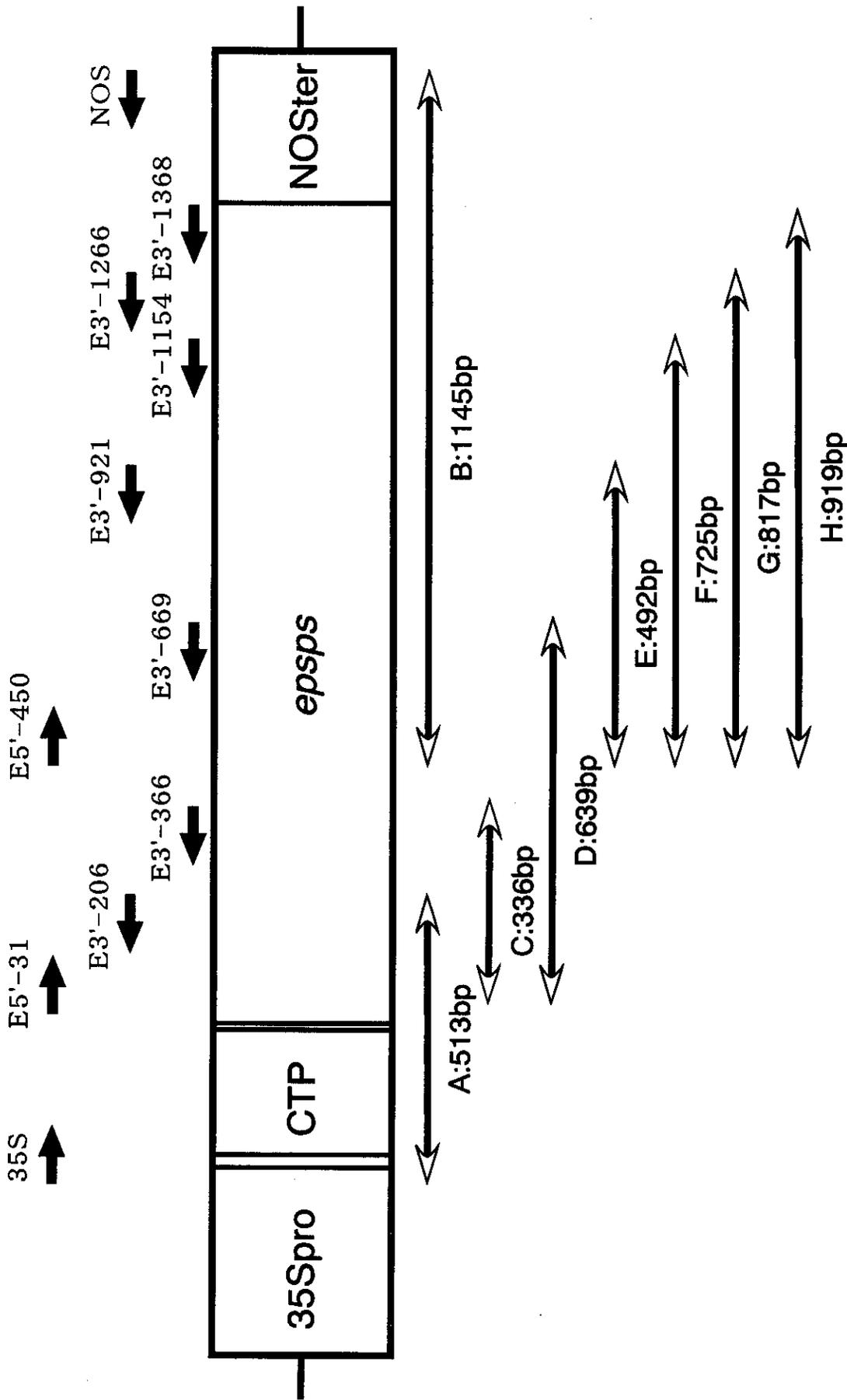


図1 除草剤耐性ダイズに導入されているepsps遺伝子の構造及びPCRに用いたプライマーの位置と増幅断片

35Spro:カリフラワーマゼイクウイルス35Sプロモーター

CTP:プラスチド移行配列

epsps:エノールピルビルシキミ酸3リン酸合成酵素遺伝子

NOSter:ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター

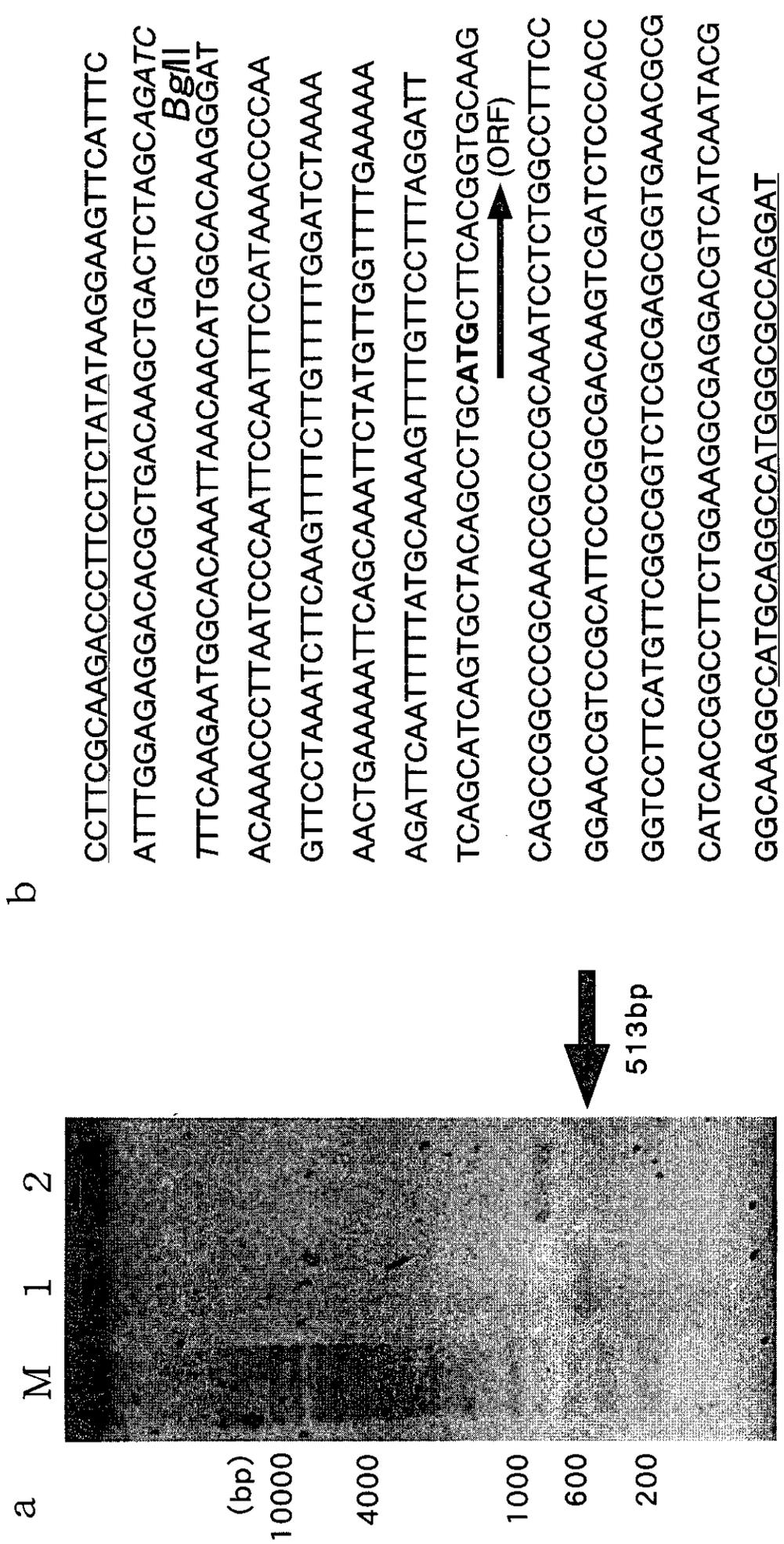


図2 PCRにより検知された組換えサイズの増幅断片(a)とその塩基配列(b)

(a) M:分子量マーカー

1:35S⇔E3'-206の増幅断片 (図1-A)

2:内在性のレクチン遺伝子の増幅断片

(b)下線:プライマーサイト

斜体:制限酵素(BglII)認識配列