

behavior. *Hormones and Behavior* 54, 506-513.

- 5). Andreeva, LE, Khaidarova, NV, Sleptsova, LA, Rodrigues-Blanco, EV, Dicheva, MA, Dvoryanchikov, GA, Tarantul, VZ (2008). The effect of regulatory sequences of alpha S1-casein gene on the expression of the lacZ-gene in loach *Misgurnus fossilis* L. transgenic embryos. *Russian Journal of Genetics* 44, 867-872.
- 6). Neregard, L, Sundt-Hansen, L, Hindar, K, Einum, S, Johnsson, JI, Devlin, RH, Fleming, IA, Bjornsson, BT (2008). Wild Atlantic salmon *Salmo salar* L. strains have greater growth potential than a domesticated strain selected for fast growth. *Journal of Fish Biology* 73, 79-95.
- 7). Chen, HL, Li, SS, Huang, R, Tsai, HJ (2008). Conditional production of a functional fish growth hormone in the transgenic line of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *Journal of Phycology* 44, 768-776.
- 8). Liu, SM, Zhang, XC, Zang, XN, Liu, B, Arunakumara, KKIU, Xu, D, Zhang, XQ (2008). Growth, feed efficiency, body muscle composition, and histology of flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed GH transgenic *Synechocystis*. *Aquaculture* 277, 78-82.
- 9). Wong, AC, Van Eenennaam, AL (2008). Transgenic approaches for the reproductive containment of genetically engineered fish. *Aquaculture* 275, 1-12.
- 10). Aikio, S, Valosaari, KR, Kaitala, V (2008). Mating preference in the invasion of growth enhanced fish. *OIKOS* 117, 406-414.
- 11). Hobbs, RS, Fletcher, GL (2008). Tissue specific expression of antifreeze protein and growth hormone transgenes driven by the ocean pout (*Macrozoarces americanus*) antifreeze protein OP5a gene promoter in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Transgenic Research* 17, 33-45.
- 12). Levesque, HM, Shears, MA, Fletcher, GL, Moon, TW (2008). Myogenesis and muscle metabolism in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) made transgenic for growth hormone. *Journal of Experimental Biology* 211, 128-137.

#### 遺伝子組換えアユが記載された論文

- 1). Cheng, CA, Lu, KL, Lau, EL, Yang, TY, Lee, CY, Wu, JL, Chang, CY (2002). Growth promotion in ayu (*Plecoglossus altivelis*) by gene transfer of the rainbow trout growth hormone gene. *Zoological Studies* 41, 303-310

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 遺伝子組換えティラピアに関する文献情報

Rahman, M.A., Maclean, N., 1992. Production of transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one-cell-stage microinjection. *Aquaculture* 105, 219-232.

マイクロインジェクション法による受精卵への遺伝子導入は多くの魚種で成功している。ティラピアは短い世代期間のため、重要な温水性食料魚である。ティラピアに対する遺伝子導入は多細胞の胚胎へのマイクロインジェクションに成功しているだけで、その結果が導入遺伝子のモザイク性の示唆や F1 への導入遺伝子の生殖細胞への伝達に失敗している原因である。本報では、ティラピアの 1 細胞期に遺伝子(マウスメタロチオンインプロモーター-ラット GH 遺伝子)をマイクロインジェクションして、遺伝子組換えティラピアを作成したことを報告する。スロットブロッキングは多くのティラピアで導入遺伝子の存在を示している。サザンブロッキングパターンはマイクロインジェクションして発生したティラピアのうち、約 20% がゲノムへ挿入されたことを示した。発生した遺伝子組換えティラピアの多くはある組織だけに存在するモザイク性を示した。ある雄の遺伝子組換えティラピアの分析では、精子に含まれていることがわかった。ティラピアのプロモーターの下流に細菌の CAT 遺伝子を繋げたプラスミッドを導入して、遺伝子の発現を調べるため使用された。この試験では約 30% が陽性の結果だった。

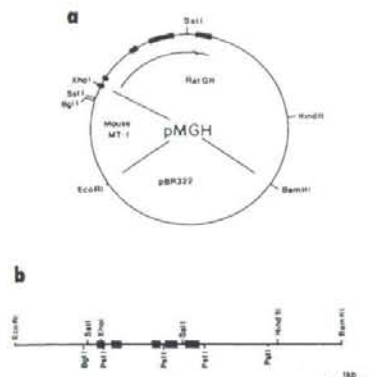


Fig. 1. (a) The circular plasmid construct pmMTRGH, consisting of the plasmid pBR322, the regulatory 5' prime upstream section of the mouse metallothionein-1 gene, and the coding sequence of the rat growth hormone gene. The entire construct is 8.9 kb. Coding exons are shown as black boxes. (This construct was kindly provided by D. Hamer.) (b) The 6.6 kb EcoRI-BamHI fragment of the above plasmid, used for injection and as a probe for slot blot and Southern transfer. Note especially the PstI sites on this fragment, which yield sub-fragments of 1.78, 1.5, 1.28, 1.21 and 0.85 kb. These sub-fragments are those visualized on the gels in Fig. 5.

Alam, M.S., Lavender, F.L., Iyengar, A., Rahman, M.A., Ayad, H.H., Lathe, R., Morley, S.D., Maclean, N., 1996. Comparison of the activity of carp and rat  $\beta$ -actin gene regulatory sequences in tilapia and rainbow trout embryos. *Molecular Reproduction and Development* 45, 117-122.

コイとラットの  $\beta$ -actin 調節領域を使って lacZ の発現パターンをティラピアとニジマスの稚魚と比較した。DNA はティラピアとニジマスの受精卵にインジェクションし、いろいろな発生時期に  $\beta$  ガラクトシダーゼの活性を調べた。両種で、ラットよりコイの  $\beta$ -actin 活性の方が高いことが示された。

Alam, M.S., Popplewell, A., Maclean, N., 1996. Germ line transmission and expression of a lacZ containing transgene in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Research* 5, 87-95.

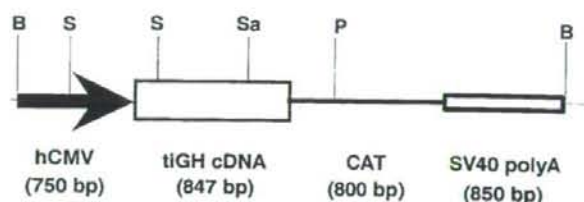
遺伝子組換えティラピアがコイ  $\beta$ -actin-lacZ コンストラクトを用いて作出され、F1 への伝達が確認された。この F1 の 36 尾のうち、9 尾(25%)で少なくとも 1 つの組織で導入遺伝子が確認され、これらの個体のうち 2 尾が子供へ導入遺伝子を伝達した。1 尾の雄が 28 尾中 3 尾の導入遺伝子陽性の個体を作った(10.7%)が、これらの個体は導入遺伝子を発現していなかった。残りの 1 尾は 1601 尾中 243 尾の lacZ が発現している子供(15.2%)を作った。このうち、40 尾がサザンブロッキングで解析されたが、

全て導入遺伝子陽性であったが導入遺伝子の2つの違ったパターンが認められた。3つの違った発現パターンも観察された。これらは複数の挿入がおこった結果で、挿入硬化によるものであると推察された。

Martínez, R., Estrade, M.P., Berlanga, J., Guillén, I., Hernández, O., Cabrera, E., Pimentel, R., Morales, R., Herrera, F., Morales, A., Piña, J.C., Abad, Z., Sánchez, V., Melamed, P., Leonart, R., de la Fuente, J., 1996. Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5(1), 62-70.

GH 遺伝子を導入した組換え魚類の作出は経済的に重要な魚種の成長を操作する新しい可能性を開いた。ティラピア GHcDNA をヒト CMV エンハンサー-プロモーターにつなぎ、1細胞期にマイクロインジェクションすることによって遺伝子組換えティラピアを作出した。40尾のインジェクションした稚魚から5尾の遺伝子組換えティラピアが得られた。1細胞当たり1コピー挿入された遺伝子組換えティラピアが選別され、遺伝子組換え系統として確立された。導入遺伝子はメンデルの法則に則って、F1からF2へ伝達された。異所的に、低レベルのティラピア GH がF1の生殖腺と筋肉中で免疫組織学的方法により組織切片上で検出された。9ヶ月齢の遺伝子組換えティラピアは非遺伝子組換えティラピアより82%大きかった ( $P < 0.01$ )。これらの結果は遺伝子組換えティラピアの低レベルの異所的な GH の発現が成長を促進したことを示している。ティラピア GH 遺伝子導入はティラピアの成長を促進する1手法である。

Figure 1. Structure of the tiGH transgene. The *O. aureus* × *O. hornorum* tiGH cDNA was cloned into the expression vector E300 to generate the plasmid E300tiGH15. The *Bam*HI fragment was excised and used for microinjection. Dotted lines correspond to pML2 sequences. Abbreviations: B, *Bam*HI; S, *Sac*I; Sa, *Sa*I; P, *Pvu*II; SV40 polyA, polyadenylation site of SV40.



検出 primer: 5' -GACCTCCATAGAAGACACC-3'

5' -AAGATCCCGTTTAAAGCTCAG-3'

CMV プロモーターと tiGH の領域で作成

Hernández, O., Guillén, I., Estrada, M.P., Cabrera, E., Pimentel, R., Piña, J.C., Abad, Z., Sánchez, V., Hidalgo, Y., Martínez, R., Leonart, R., de la Fuente, J., 1997. Characterization of transgenic tilapia lines with different ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular Marine Biotechnology* 6(4), 364-375.

GH 遺伝子の導入は経済的に重要な魚種で成長を操作する可能性を開いた。しかし、ティラピアを含む、魚類の成長を最適にする異所的な GH の発現は知られていないし、実験的に確かめられなければならない。ティラピア GHcDNA が *in vitro* と *in vivo* で異なった GH レベルを発現するために利用された。これらのコンストラクトは1細胞期の卵にマイクロインジェクションによって導入され、4つの遺伝子組換えティラピア系統が作出された。遺伝子組換えティラピアの器官での RNA やタンパク解析によって GH や IGF の異なったパターンや異なった場所での発現レベルが観察された。異なった場所で低いレベルのティラピア GH mRNA を発現する2つの系統が成長促進を示し、異所的な GH の発現が低い発現レベルでも成長を促進することを示した。高い GH を発現する影響は生理学的に低い状態の状況に似ていて、異所的に GH 発現をしている遺伝子組換えティラピアにおいて成長を促進させるモデルとなる。

Rahman, M.A., Iyengar, A., Maclean, N., 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, 369-378.



ティラピアでは商業的に重要な GH 遺伝子を含んだプラスミッドの低い導入効率を改善するため Co-injection 方法が採用されている。レポーター遺伝子との co-injection 法の高い導入効率は GH 遺伝子を含んだプラスミッドの導入効率を 3 倍に引き上げた。さらに、13 尾の GH 遺伝子組換えティラピアのうち、第 1 世代から第 2 世代に継代する時にメンデルの遺伝の法則による比の通りに 3 尾が継代された。また、第 1 世代と第 2 世代の両方で導入遺伝子の発現を確認した。2 つの遺伝子 (GH とレポーター遺伝子) が挿入されたことを示し、このことが成長ホルモン遺伝子の効率よい導入と伝達、発現を増加させていることを説明できることを示した。このようにして、GH を発現している遺伝子組換えティラピアを作出した。

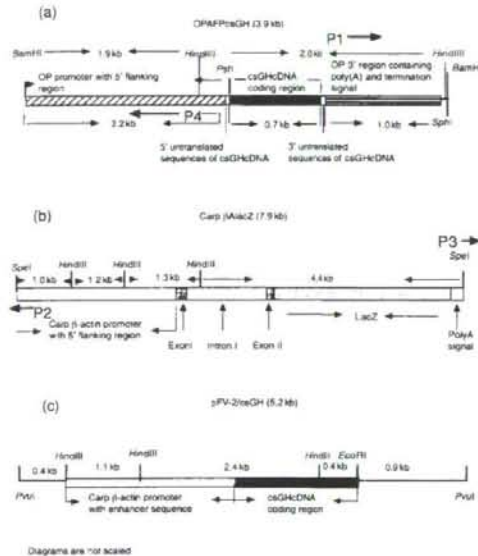


Fig. 1. (a) The OPAFPcsGH isolated from the plasmid by digestion with *Bam*HI which is used for microinjection and showing the restriction sites for *Hinf*III. P1 and P3 are the PCR primers used. (b) The *Carp* $\beta$ AlacZ fragment isolated from the plasmid by digestion with *Spe*I which is used for microinjection and showing the restriction sites for *Hinf*III. P2 and P4 are the PCR primers used. (c) The pFV-2lacGH fragment isolated from the plasmid with restriction sites and was used as a probe to hybridize to regions of both the *Carp* $\beta$ AlacZ and OPAFPcsGH gene constructs.

Chen, J., Tsai, H., Chang, C., Wang, J., Shen, s., Wu, J., 1998. Isolation and characterization of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) insulin-like growth factors gene and proximal promoter region. *DNA and Cell Biology* 17(4), 359-376.

インシュリン様成長因子 IGFs の転写をコントロールする分子メカニズムを調べるため、ティラピア IGFs のプロモーター領域をクローニングし、シーケンスを行った。そして、一過性の発現試験を行うため、CAT 活性を調べた。ティラピア *Oreochromis mossambicus* IGF-I cDNA (549bp) が GH cDNA で誘導した肝臓中の RNA を用いて、IGF-I を増幅するプライマーを用いて増幅された。ティラピア IGF-I と IGF-II の 5' 末端の cDNA がレース法によって解析された。その結果、IGF-I の 2 つの転写開始点と IGF-II の 1 つの転写開始点が見つかった。異なった 5' 側隣接領域の断片がヒト肺腺癌由来培養細胞にトランスフェクションされた。培養細胞において、最大プロモーター活性は IGF-I の 5' 隣接領域の末端 657bp と IGF-II 5' 隣接領域の末端 450bp の領域であった。発生途中での *in vivo* での IGFs プロモーター活性は IGFs プロモーターに GFP cDNA を繋げた配列をゼブラフィッシュにマイクロインジェクションして調べられた。遺伝子組換えゼブラフィッシュの形態的及び RT-PCR の結果は IGF-I プロモーターによる GFP 転写物は最初に 1-K 細胞期に認められ、IGF-II プロモーターによる GFP 転写物は 32 細胞期に初めて認められた。GFP の分布は 48 時間後に IGF-II の遺伝子組換えゼブラフィッシュで現れ、特に、眼、筋肉、

赤血球、底板 floor plate、水平筋節中隔、卵黄囊周辺 extension、卵黄囊に認められた。これらの結果は IGF-I と IGF-II は器官別、発生時期特異的に活性化していることを示している。また、この発見は IGF-II プロモーターは IGF-I よりも早い発生ステージの稚魚の成長に影響し、IGF-II は IGF-I より高い発現レベルであることを示している。これらの結果は IGF-II プロモーターは硬骨魚類稚魚の発生時に成長因子の役割を果たしていることを示している。

注) これらの研究は台湾の研究者によって行われた。中華人民共和国(中国)ではない。

Rahman, M. A., Mak, R., Ayad, H., Smith A., Maclean, N., 1998. Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Research* 7, 357-369.

魚類由来の GH 遺伝子配列を持つプラスミッドをマイクロインジェクションによって受精卵に導入し、遺伝子組換えティラピアの第 1 世代と第 2 世代の数系統が作られた。Ocean pout *Macrozoarces americanus* の抗凍結遺伝子プロモーターとマスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha* GH 遺伝子をつなげたプラスミッドを使って、第 2 世代の 7 ヶ月齢の平均体重が非遺伝子組換えティラピア(兄弟)の体重の 3 倍以上という劇的な成長促進が示された。驚いたことに、ベニサケメタロチオネインプロモーターに同種の GH 遺伝子をつなげて作ったプラスミッド (OnMTGH1: Devlin 提供) を導入して作出した遺伝子組換えサケは成長促進効果を示したが、同じプラスミッドを導入した遺伝子組換えティラピア第 1 世代は成長促進を示さなかった。成長が促進された遺伝子組換えティラピア系統はラジオイムノアッセイで血清中の特異的なホルモンに対して強い陽性を示したが、成長促進を示さなかった系統は陰性であった。亜鉛を増加させた環境中に魚を曝露したにもかかわらず、成功しなかった。Ocean pout の抗凍結遺伝子プロモーターとマスノスケ GH 遺伝子をつなげたプラスミッドを使って(導入遺伝子が)ホモ接合性の遺伝子組換えティラピアを作出したが、予備実験では成長促進は半接合性の遺伝子組換えティラピアの成長と同じであった。頭部形態のわずかな変化と何尾かの遺伝子組換えティラピアで妊性の減少に気がついたが、成長促進ティラピアにおいて、奇形は現れなかった。成長促進遺伝子組換えティラピアは非遺伝子組換えティラピア(兄弟)に比較して、餌料変換効率が改善されたという予備的証拠も示された。この研究の最終目標は成長の促進と不妊化を行い、養殖業に重要な食料魚の形質を改善し、提供することである。

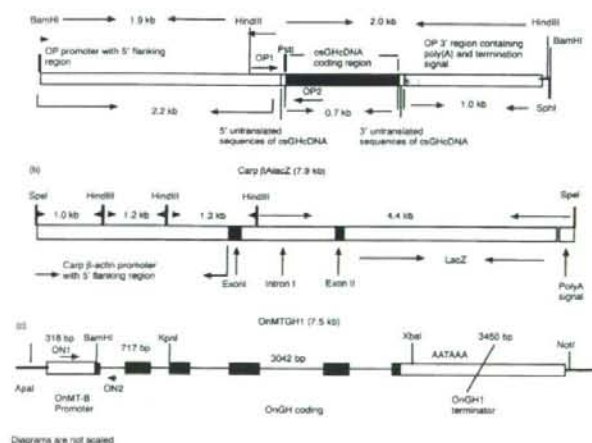


Fig. 1. (a) The OPAFPcGH construct isolated from the plasmid after digestion with *Bam*HI and used for microinjection, showing the restriction sites for *Hind*III. Primers OP1 and OP2 were used in the PCR reactions to identify transgenic fish. (b) The Carp  $\beta$ -actin construct isolated from the plasmid after digestion with *Spe*I and used for microinjection, showing the restriction sites for *Hind*III. (c) The OnMTGH1 construct isolated from the plasmid after digestion with *Spe*I and *Xba*I and used for microinjection, showing the restriction sites for *Xba*I and *Bam*HI. Primers ON1 and ON2 were used in the PCR reactions to identify transgenic fish.

#### OPAFPcGH 検出 primer

OP1: 5' -GTCAGAAGTCTCAGCTACAGC-3'

OP2: 5' -ACAGAAGTCCAGCAGGAATAT-3'



OnMTGH1 検出 primer

ON1: 5' -CTGATTAAGTTTTGTATAGT-3'

ON2: 5' -GTAAATTGTATTAATGGT-3'

Razak, S.A., Hwang, G., Rahman, M.A., Maclean, N., 1999. Growth performance and gonadal development of growth enhanced transgenic tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) following heat-shock induced triploidy. Mar. Biotechnol. 1, 533-544.

魚類の3倍体誘起は、繁殖能力をかなり減少させるので、遺伝子組換え魚類が環境に対して不利なインパクトを与えることを減少させられる。不妊化した成長促進遺伝子組換え魚類を作出するため、2つの系統の遺伝子組換えティラピアを用いて高温刺激による3倍体を作成した。3倍体ティラピアの成長特性と生殖腺発達を解析された。3倍体ティラピアは赤血球の核径を測定することによって確認された。3倍体の赤血球核径は2倍体より1.5倍大きい。成長特性と生殖腺発達の観察は遺伝子組換えと非遺伝子組換え全兄弟バッチ由来の2倍体と3倍体ティラピアを用いて比較した。2倍体遺伝子組換えティラピアの成長特性が優れ、続いて、3倍体遺伝子組換え、2倍体非遺伝子組換え、3倍体非遺伝子組換えティラピアの順であった。3倍体遺伝子組換えティラピアの精巣は3倍体や2倍体の非遺伝子組換えティラピアの精巣より有意に小さかったけれども、組織学的に奇形の兆候は示さなかった。3倍体ティラピアの中には精巣の中に、再生産の機能性を示すような精子の存在があった。しかし、すべての3倍体ティラピアの卵巣は卵母細胞の欠如、未発達、奇形を示し、完全に機能していなかった。もっともよい成長特性は妊性のある2倍体遺伝子組換えティラピアで示されたが、3倍体遺伝子組換え雌ティラピアは養殖目的のためには、野生型ティラピアより優れた成長を示し、また、交雑も確実に起こさないし、地域の遺伝子プールとコンタミを起こさないといったことから、よい選択肢を提供する。しかし、商業利用に先立っては、潜在的な遺伝子流動に対する慎重なモニタリングが必要とされる。

DNA Construct :

OPAFPcsGH: ocean pout antifreeze gene promoter + Chinook salmon GH cDNA

Carp  $\beta$ AlacZ reporter gene: Carp  $\beta$ -actin regulatory sequences + bacterial  $\beta$ -galactosidase gene

de la Fuente, J., Guillén, I., Martínez, R., Estrada, M.P., 1999. Growth regulation and enhancement in tilapia: basic research findings and their applications. Genetic Analysis: Biomolecular Engineering 15, 85-90.

魚類の成長操作においては遺伝子導入実験が1つのターゲットになる。その目的は成長特性を改良した品種を作出することである。成長ホルモン遺伝子の導入は何種類かの魚種で成功している。魚類の成長をコントロールする詳細な分子レベルでのイベントの知識がこの過程を効率的に操作するために必要である。我々は養殖業で改善されるべき品種であり、実験動物としても有用なティラピアをこの研究対象にした。最初にティラピアの成長をコントロールしたり、操作したりした基礎及び応用研究についてレビューする。そしてこれらの実験はティラピアの成長をコントロールする新しい科学的結果をもたらした。これらの結果は成長特性を改良した新しい養殖品種として使用される。多くの結果は他の硬骨魚類でも応用可能である。

Guillén, I., Berlanga, J., Valenzuela, C.M., Morales, A., Toledo, J., Estrada, M.P., Puentes, P., Hyes, O., de la Fuente, J., 1999. Safety evaluation of transgenic tilapia with accelerated growth. Marine Biotechnology 1, 2-14.

近代海洋バイオテクノロジーは経済的に重要な魚種でGH遺伝子導入による新しい品種を作出した。これらの遺伝子組換え魚は成長促進を改善しているので、養殖事業にとって良い改善となっている。最近、成長を促進する遺伝子組換えティラピアを作出した。しかし、この品種をキューバの養殖業に導入する前に、国から環境への安全性と食品としてのリスク評価が求められている。遺伝子組換えティラピアをキューバの養殖業へ導入するのに伴い、遺伝子組換えティラピアの習性について環境への影響を評

価するため、野生型ティラピアと比較する実験が行われた。研究は実質的同等性にもとづき、遺伝子組換えティラピアを食料として利用する安全性について行われた。行動研究は遺伝子組換えティラピアはコントロールに比べ、低い摂餌意欲と行動における優位性を示した。食品安全性評価によって、ティラピア GH はそれをヒト以外の霊長類に与えても生物学的活性は何も無かったことを示した。さらに、遺伝子組換えティラピアを食べてもらったボランティアの健康にも影響を与えなかった。少なくとも、これらの結果はキューバでは、遺伝子組換えティラピアの導入に対して環境へ引き起こされる結果は何も無いし、ヒトへの選択的な食料源として遺伝子組換えティラピアを消費しても何も影響無い、ということを示した。これらの結果は遺伝子組換えティラピアの養殖と消費を支持している。

Martínez, R., Arenal, A., Estrada, M.P., Herrera, F., Huerta, V., Vázquez, J., Sánchez, T., de la Fuente, J., 1999. Mendelian transmission, transgene dosage and growth phenotype in transgenic tilapia (*Oreochromis hornorum*) showing ectopic expression of homologous growth hormone. *Aquaculture* 173, 271-283.

遺伝子導入は養殖のための魚類品種改良の発展に新しい道具を提供する。しかし、これらの品種が国の養殖プログラムに組み入れられる前に特性解析が要求される。ヒト CMV プロモーターの下流にティラピア GH を繋げた遺伝子を発生初期の胚にマイクロインジェクションして遺伝子組換えティラピア *O. hornorum urolepis* を作出した。遺伝子組換えティラピア系統を確立するため、導入遺伝子が 1 細胞当たり 1 コピー挿入された雄が選ばれた。導入遺伝子は F1 から F4 までメンデルの法則の通り伝達された。予備実験で遺伝子組換えティラピアの脳、心臓、生殖腺、肝臓、筋肉細胞でティラピア GH の異所的な、低いレベルの発現を確認した。生化学的解析では遺伝子組換えティラピアの筋肉中で低レベルのコレストロール、フリーのアラニン、アスパラギン酸も確認された。4 ヶ月齢の (2 つの導入遺伝子を持った) ホモ接合性遺伝子組換えティラピアティラピア ( $F_2^{+/+}=6$  尾) と (1 つの導入遺伝子を持った) ヘテロ接合性遺伝子組換えティラピア ( $F_2^{-/+}=8$  尾) と非遺伝子組換えティラピア (兄弟; 11 尾) を 3 ヶ月間同じ池で飼育して調べた。遺伝子組換えティラピアは非遺伝子組換えティラピア (兄弟) より大きく ( $P=0.009$  ( $F_2^{+/+}+F_2^{-/+}$ )、 $P=0.05$  ( $F_2^{-/+}$ )、 $P=0.07$  ( $F_2^{+/+}$ ) ; スチューデントの t 検定)、導入遺伝子の量的効果を示した。これらの結果は成長促進遺伝子組換えティラピア品種の確立を意味する。

Rahman, M.A., Maclean, N., 1999. Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene. *Aquaculture* 173, 333-346.

Ocean pout *Macrozoarces americanus* の抗凍結遺伝子プロモーターにマスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha* GH 遺伝子をつなげたプラスミッドを導入した遺伝子組換えティラピア *Oreochromis niloticus* の 3 つの系統を作った。1 コピーから複数コピーの導入遺伝子が宿主ゲノム上の 1 カ所に挿入された。生殖細胞系にモザイク上に分布した 3 系統で、遺伝子導入世代 (G0) から次世代 (G1) への伝達率は 10% 以下であった。しかし、第 1 世代 (G1) から第 2 世代 (G2) への伝達率は予想されたメンデル比にしたがった。マスノスケ GH の発現はこれらの系統の G0、G1、G2 世代で示され、劇的な成長を示した。G1 と G2 の平均体重は非遺伝子組換えティラピア (兄弟) の 3 倍 ( $P<0.01$ ) を示した。



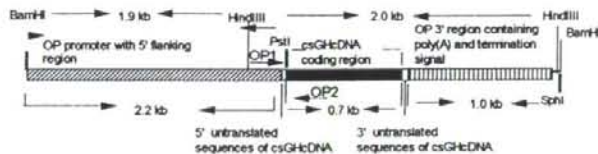
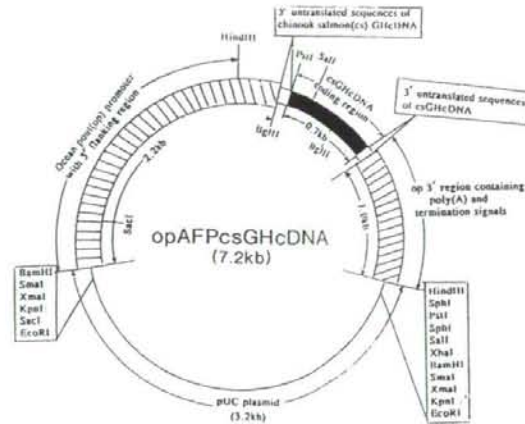


Fig. 1. (a) The opAFPcsGH construct (Du et al., 1992) isolated from the plasmid after digestion with *Bam*HI and used for microinjection, showing the restriction sites for *Hind*III. Primers OP1 and OP2 were used in the PCR reactions to identify transgenic fish.

DNA Construct:

OPAFPcsGH: ocean pout antifreeze gene promoter + Chinook salmon GH cDNA

Carp  $\beta$ ALacZ reporter gene: Carp  $\beta$ -actin regulatory sequences + bacterial  $\beta$ -galactosidase gene

検出 primer:

OP1: 5' -GTCAGAAGTCTCAGCTACAGC-3'

OP2: 5' -ACAGAAGTCCAGCAGGAATAT-3'

Martínez, R., Juncal, J., Zaldívar, C., Arenal, A., Guillén, I., Morera, V., Carrillo, O., Estada, M., Morales, A., Estrada, M. P., 2000. Growth efficiency in transgenic tilapia (*Oreochromis* sp.) carrying a single copy of an homologous cDNA growth hormone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267, 466-472.

成長ホルモンは魚類生理や代謝に重要な影響を持っている。しかし、遺伝子組換え魚について詳細な研究は行われていない。ヒト CMV プロモーターによってティラピア GHcDNA を発現している遺伝子組換えティラピアを使って、餌料変換効率、タンパクプロフィール、成長率の生化学的関連性について調べた。遺伝子組換えティラピアは非遺伝子組換えティラピアより約 3.6 倍餌料消費を減少させた ( $P < 0.01$ )。餌料変換効率はコントロール ( $0.8 \pm 0.2$ ) に対し、遺伝子組換えティラピア ( $2.3 \pm 0.4$ ) で 290% 高かった ( $P < 0.05$ )。成長効率、合成保持率 synthesis retention、同化作用刺激 anabolic stimulation、平均タンパク合成は非遺伝子組換えティラピアより遺伝子組換えティラピアで高かった。特異的な代謝の差異が遺伝子組換えティラピアの幼魚で見つかった。肝臓でのグルコースの違い (これは以前に標的器官での酵素活性レベルの違いを観察していたことと一致していた) が見いだされた。この結果から、GH 遺伝子組換えティラピアの幼魚は生理及び代謝状態が違って、生物学的により効率的であることがわかった。

Rahman, M. A., Hwang, G., Razak, S. A., Sohm, F., Maclean, N., 2000. Copy number related transgene



expression and mosaic somatic expression in hemizygous and homozygous transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). Transgenic Research 9, 417-427.

コイの  $\beta$  アクチン遺伝子の 5' 側調節領域 4.7kb に lacZ レポーター遺伝子をつなげた遺伝子を導入した遺伝子組換えティラピアを 3 系統作出した。3 つの系統は異なるコピー数の導入遺伝子を持ち、lacZ の発現は導入遺伝子のコピー数に関連していることが見いだされた。体細胞の lacZ 発現のモザイクパターンが 3 つの系統の間で、系統間では異なるが、同一系統内では一定であることが観察された。また、(導入遺伝子が)ホモ接合性の遺伝子組換えティラピアにおけるレポーター遺伝子の発現は半接合性の遺伝子組換えティラピアより 2 倍発現したことを観察した。tissue-to-tissue basis におけるレポーター遺伝子の発現の解析は安定に形質転換された魚におけるレポーター遺伝子の lacZ の発現はいろいろな強度で、いろいろな器官と組織で起こり、遺伝子組換えティラピアの G1 (導入世代から 1 世代目: 著者注) と G2 (導入世代から 2 世代目: 著者注) の同じ組織の違った細胞で時々変化することが示された。

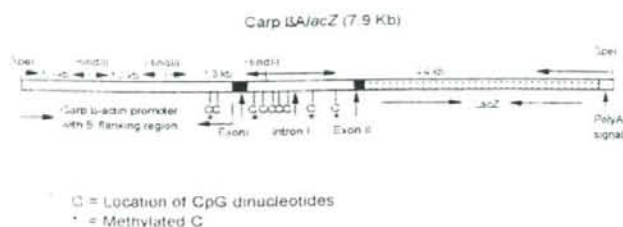


Figure 1. Diagram showing the transgene construct used to produce the three lines of transgenic fish. The 7.9 kb fragment shown was isolated from the plasmid by digestion with *SpeI* and used for injection in this linear form. Restriction sites for *HindIII* are shown and known CpG dinucleotides (C) and CpG sites believed to be methylated in some of our fish (C\*) are indicated.

Rahman, M. A., Ronyai, A., Engidaw, B. Z., Jauncey, K., Hwang, G-L., Smith, A., Roderick, E., Penman, D., Varadi, L., Maclean, N., 2001. Growth and nutritional trials on transgenic Nile tilapia containing an exogenous fish growth hormone gene. J. Fish Biol. 59, 62-78.

長期間成長試験で、遺伝子組換えティラピア *Oreochromis niloticus* は非遺伝子組換えティラピア (兄弟) に比べ、2.5 倍成長が良かった。7 ヶ月間で平均体重は遺伝子組換えティラピアはコントロールの非遺伝子組換えティラピア (兄弟) の 260g に比べ、635g を示した。頭長: 全長比、内臓-体細胞指数 (?), 肝臓-体細胞指数 (?) において有意な増加 ( $P < 0.01$ ) が遺伝子組換えティラピアで観察された。雌の生殖腺-体細胞指数 ( $I_c$ ) は遺伝子組換えと非遺伝子組換えティラピアの混合飼育あるいは分離飼育のどちらでも非遺伝子組換えティラピア (兄弟) よりも遺伝子組換えティラピアの方が低かった。遺伝子組換えティラピアの雄の  $I_c$  値は非遺伝子組換えティラピアとの混合飼育で高く、分離飼育で低かった。餌料変換効率は遺伝子組換えティラピアの方が 20% 以上高かった。2 回の短期間成長特性試験では遺伝子組換えティラピアは非遺伝子組換えティラピア (兄弟) よりも約 4 倍成長した。消化率試験では遺伝子組換えティラピアは蛋白質、乾燥物質、エネルギーをより効率的に利用することを示した。遺伝子組換えティラピアの方が明らかにタンパクとエネルギーの消化率が高かった。

#### DNA Construct:

OPAPCsGH: ocean pout antifreeze gene promoter + Chinook salmon GH cDNA

Carp  $\beta$ ALacZ reporter gene: Carp  $\beta$ -actin regulatory sequences + bacterial  $\beta$ -galactosidase gene

#### 検出 primer:

P1: 5' -ACCTGTGGAGACTGTTGAGAT-3'

P2: 5' -CTACTTAGACCACCTCAATTGG-3'

外来 GH と reporter gene の配列を利用

Maclean, N., Rahman, M.A., Sohm, f., Hwang, G., Iyengar, A., Ayad, H., Smith, A., Farahmand, H., 2002. Transgenic tilapia and the tilapia genome. *Gene* 295, 265-277.

ティラピア *Oreochromis niloticus* は発展途上国の養殖業において重要な位置を占めている。また、実験動物としても大変有用で、簡単に遺伝子組換え技術の材料になる。ティラピアを用いて、レポーター遺伝子を使用しながら一時的あるいは安定的な発現について調べた。遺伝子導入技術を用いて、成長促進した遺伝子組換えティラピアを作出した。これらの遺伝子組換えティラピアは奇形にならず、将来有望な有用性を示した。しかし、遺伝子組換え魚を将来養殖に利用するためには不妊化することが重要で、不妊化をするいろいろな方法が考えられなければならない。これらの中には3倍体性の利用、遺伝子組換えによる重要なホルモン遺伝子のノックアウト、リボソームやアンチセンステクノロジーによる遺伝子の機能をノックダウンさせる方法が含まれる。また、遺伝子組換えティラピアは有用な製剤産生におけるバイオリアクターとしての開発する潜在力がある。

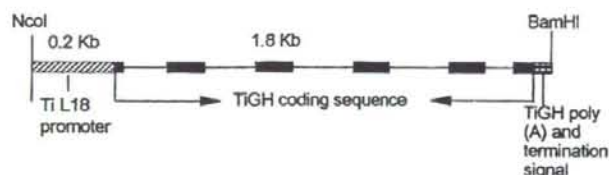


Fig. 3. Diagram of an 'all-tilapia' GH construct in which a tilapia GH coding sequence is driven by a tilapia L18 (ribosomal protein) promoter. Black boxes represent the exons. Thin lines represent the introns. Diagram is not to scale.

(著者注：2002年のこの論文で遺伝子組換えティラピアに関する仕事は2つの研究室 (de la Fuente; キューバと Maclean; イギリス) で行われている、と記述。中国に関する記述はない。)

Mckenzie, D. J., Martinez, R., Morales, A., Acosta, J., Morales, R., Taylor, E. W., Steffensen, J. F., Estrada, M. P., 2003. Effects of growth hormone transgenesis on metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance in tilapia hybrids. *J. Fish Biol.* 63, 398-409.

GH 遺伝子導入組換えティラピアと野生型ティラピア *Oreochromis* sp. を用いて、遊泳時の呼吸計測が不活性時代謝率 (inactive metabolic rate:  $R_r$ )、最大代謝率 (maximum metabolic rate:  $R_{max}$ )、その結果としての aerobic scope と最大(臨界)遊泳スピード (maximum sustainable swimming speed:  $U_{crit}$ ) を比較した。遺伝子組換えティラピアの  $R_r$  は同種の野生型に比べ有意に高かった (58%) が、遺伝子組換えティラピアは  $R_r$  の正味の増加と同じだけ  $R_{max}$  を補償して増加するので、正味の aerobic scope において有意な差はない。結果として、2つのグループは同じ  $U_{crit}$  を持つ。また、遺伝子組換えティラピアは酸素を多く要求するにもかかわらず、遺伝子組換えティラピアと野生型ティラピアは斬新的な低酸素状態の間、酸素消費量を調節するのに同じ能力を持つことを示した。ティラピアでは GH の異所的発現は代謝率を上昇させるが、aerobic scope、遊泳特性、低酸素状態に対する耐性のような適応性の生理学的決定因子は保持されている。

導入遺伝子：ヒト CMV プロモーター--ティラピア GHcDNA by de la Fuente *et al.* (1995)

使用魚種：*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis hornorum* の雑種 F1

Hwang, G., Rahman, M. A., Razak, S. A., Sohm, F., Farahmand, H., Smith, A., Brooks, C., Maclean, N., 2003. Isolation and characterization of tilapia  $\beta$ -actin promoter and comparison of its activity with carp  $\beta$ -actin promoter. *Biochimica et Biophysica Acta* 1625, 11-18.

ティラピア *Oreochromis niloticus* の  $\beta$ -actin エクソン1とイントロン1に近接のプロモーター領域を含む配列が単離され、活性を調べるために  $\beta$ -galactosidase レポーター遺伝子が繋げられた。プロモーター活性は (1) 1.6Kb の長さのティラピア  $\beta$ -actin 調節領域、(2) 1.5Kb の長さのコイ  $\beta$ -actin 調節領域、(3) 4.7Kb の長さのコイ  $\beta$ -actin 調節領域の3つの構築物を使って行われた。ティラピア



1.6Kb  $\beta$ -actin 調節領域の活性は量的試験においてコイ 4.7Kb  $\beta$ -actin 調節領域を使った活性より少し違った発現パターンであった。コイ 1.5Kb  $\beta$ -actin 調節領域と比較すると、ティラピア 1.6Kb  $\beta$ -actin 調節領域の活性はティラピア胚で高い発現レベルを示した。ゼブラフィッシュ胚を用いた発現では逆の結果をもたらした。ブルーギル細胞へのトランスフェクション実験では、ティラピア 1.6Kb  $\beta$ -actin 調節領域の活性はコイ 4.7Kb  $\beta$ -actin 調節領域やコイ 1.5Kb  $\beta$ -actin 調節領域より3から4倍高い活性を示した。また、ティラピア筋肉細胞中へ構築物を直接マイクロインジェクションすると、ティラピア 1.6Kb  $\beta$ -actin 調節領域はコイ 4.7Kb  $\beta$ -actin 調節領域より高いレポーター遺伝子活性を示した。これらのことを総合すると、ティラピア  $\beta$ -actin 調節領域は同種移植遺伝子組換えティラピアを作出するのに効率的な調節領域として使用できる。

Caelters, A., Maclean, N., Hwang, G., Eppler, E., Reinecke, M., 2005. Expression of endogenous and exogenous growth hormone (GH) messenger (m) RNA in a GH-transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). Transgenic Research 14, 95-104.

野生型の雌のティラピア *Oreochromis niloticus* と第1世代の雄の遺伝子組換えティラピアの交配によって遺伝子組換えティラピアを作ったことは前述した。この遺伝子組換えティラピアは ocean pout 抗凍結タンパクプロモーターにマスノスケ GH を繋げたもの(OPAFPesGH)とコイ  $\beta$  アクチンプロモーターと lacZ レポーター遺伝子を繋げたものを co injection して、1コピーティラピアゲノム上に挿入したものである。導入遺伝子の発現サイトについて情報というのはほとんど無いので、新しく確立した方法であるリアルタイム PCR を用いて内在性 GH (tGH) と外因性 GH (sGH) の mRNA の絶対量を測定することによって、両者の発現パターンを調べた。sGH は主に肝臓で発現していたが、鰓、心臓、脳、骨格筋、腎臓、脾臓、腸、精巣でも発現しているのが確認された。しかし、脳下垂体では sGH の発現は確認されず、tGH の発現のみが確認された。野生型ティラピア脳下垂体でティラピア GH mRNA は  $226 \pm 30$  pg/ $\mu$ g であったが、遺伝子組換えティラピアの脳下垂体中では  $187 \pm 43$  pg/ $\mu$ g であった。肝臓中では高いレベルの sGH を示した ( $8.3 \pm 2.5$  pg/ $\mu$ g) が、肝臓外で sGH の発現は鰓で  $4.1 \pm 2.0$  pg/ $\mu$ g、腎臓で  $0.2 \pm 0.08$  pg/ $\mu$ g であった。sGH の広い範囲の発現はタイプ III の AFP プロモーターの組織特異性であると思われる。他の方法と比べてこの遺伝子導入実験が器官の奇形をもたらさなかったのは個体発生中の GH 発現によく似ていたからだと思われる。肝臓と肝臓以外で発現する外因性 GH mRNA は分泌の促進と成長を促進することを導く肝臓由来の(内分泌性の) IGF-I を放出するだけでなく、異なった器官でバラクライン、オートクライン方式で IGF-I の発現を刺激するので、器官成長を促進する。

## 内在性、外因性 GH を検出するためのプライマー

Table 1. Primers and probes

Primer/probe	Sequence (5' - 3')	PCR fragment length (bp)
tGHs	TCGACAAACACGAGACCCA	
tGHss	CCCAGGACTCAACCACTCCA	73
sGHss77	CTAATACGACTCTCATAGGCCAGGACTCAACCACTCCA	93
sGHprobe	<sup>55</sup> CCGACCTGGTCTTGAAGCTCC <sup>55</sup>	
sGHs	TTGGCTCAGAAAATGTTCAATGA	
sGHss	GGAATATCTGTTCAGCTGTCTCC	76
sGHss77	CTAATACGACTCTCATAGGATATCTGTTCAGCTCTCT	94
sGHprobe	<sup>55</sup> TTTGAAGGATACCTCTGTTCAGTGAAG <sup>55</sup>	
$\beta$ -actin	GCCCACTGAGCCTAAATA	
$\beta$ -actinss	AAAGCTGGACAGGAGGCCA	60
$\beta$ -actinss77	CTAATACGACTCTCATAGGAAAGGTGGACAGGAGGCCA	80
$\beta$ -actinprobe	<sup>55</sup> TCCGCTGGATGGGAGGCTTCA <sup>55</sup>	

<sup>55</sup> Represser dye (FAM) labelled nucleotide

<sup>55</sup> Quencher dye (TAMRA) labelled nucleotide ss77: antisense primer with 77 poly(G) tail (not shown)

Table 2. Position of primers and probes

Actin	
1018	ATGCGAAGGAGATACAGCCCTGGCCCATCCACCATGAAGATCAAG
	(MBS) ← Probe (Ade) →
1066	ATCATCGCCCACTGAGGCTAAATATCCGCTGTGATCGGAGGCTTC
	← (A)ctin
1114	ATCTGGCTCTCTGCACTTTCAGCATGTGGATCAGCAAGCAGG
tGH	
231	CAGGACTTCTGAACTCTGATACATCATCTAGCTGATCGACAAAGC
	tGHs ← Probe tGHs →
274	GAGACGCAAGGCAAGCTGGTCTTGAAGCTGCTGTGTGATCTCTATGGAC
	← sGHss
357	TGGTGAAGCTCTGGAGATTTCCCACTGCTCTGTGTGGAGGCTCTCT
sGH	
152	GGTCTTCTAAATCGCGGCTCAGCTGGTGGTAACTCTCACTCTATGGC
	sGHs ← Probe sGHs →
301	TCGAAATGTTCAATGAACTTGGAGGCTTCTGTGTGGTGGTGAAGG
	← sGHss
320	AGGAGCTGAAAGAAATATCTCTGTGATCTCTGATCTCTGATCTCT

Position: 1018-1066 bp (Actin), 1114-1171 bp (tGH), 152-199 bp (sGH), 301-357 bp (sGHss)



Abad, Z., González, R., Mendoza, I., Oliva, A., Pimentel, E., Pimentel, R., Martínez, R., Estrada, M.P., Ramirez, Y., Arenal, A., 2007. Production of a high percentage of male offspring in growth-enhanced transgenic tilapia using *Oreochromis aureus* ZZ selected pseudofemales. *Aquaculture* 270, 541-545.

遺伝子導入は養殖業で魚類品種を改良する新しい道具を提供した。魚類の単性生殖集団は環境中への GMO の影響を最小にすることができる。*Oreochromis aureus* の偽雌(性転換して表現系を雌にした遺伝的雄個体)の使用によって遺伝的に雄の子供をつくる技術である。*O. aureus* の稚魚に 100 mg/餌・Kg の 17 $\beta$ -エストラジオールを 45 日間与えた。コントロールでは雌が 45.9%であったのに対し、77.1%の雌を得ることができた。処理したグループの中からランダムに雌を取り上げ、正常雄と交配した。90%以上が雌であったグループの稚魚をさらに 17 $\beta$ -エストラジオールで処理をして、F2 の偽雌を作出した。性転換の成功率は低く、雌の割合は 66.0 から 84.3%の間であった。F2 偽雌は 70 代目の遺伝子組換えティラピア雄 (*O. aureus* × *O. urolepis hornorum*) と非遺伝子組換えティラピア (*O. aureus*) 雄に交配した。正常雌との交配で雄の割合が 51.0 と 52.3%であったのに対し、F2 偽雌と遺伝子組換えティラピア雄の交配の結果、雄の割合が 90.2%、正常雌との交配では 89.3%の雄が出現し、有意な差 ( $P < 0.01$ ) で雌雄比がずれていた。偽雌を使った平均稚魚生産 (m<sup>2</sup>/日当たり) 正常な雌と遺伝子組換えティラピア雄及び正常雄との交配と同じであった。知る限りにおいて、この報告が GMO の単性生殖の最初の報告である。

Farahmand, H., Razak, S. A., Hwang, G., Rahman, M. A., Maclean, N., 2007. Induction of tetraploidy in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) using physical shocks. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 7(1), 27-46.

野生型のティラピアと交配した成長促進した遺伝子組換えティラピア C118 系統を使って、低温処理、高温処理、複数回高温処理によって 4 倍体作出が試みられた。複数回高温処理 (受精後 60 分と 80 分後に 41°C、5 分の高温処理を 2 回行う) 後に、 $\beta$  ガラクトシダーゼ発現の高さと染色体の 4 倍体化が正の相関によって 15 尾のうち、2 尾が 4 倍体遺伝子組換えティラピアであることが示された。成長した遺伝子組換えティラピアは赤血球の径の測定と染色体数の計測によって、第 1 世代 G1 においては 4 倍体と 2 倍体細胞のモザイク性が示された ( $P < 0.05$ )。しかし、2 倍体野生型との交配によって 3 倍体の作出に成功した証拠は得られなかった。

Eppler, E., Caelters, A., Shved, N., Hwang, G., Rahman, A. M., Maclean, N., Zapf, J., Reinecke, M., 2007. Insulin-like growth factor I (IGF-I) in a growth-enhanced transgenic (GH-overexpressing) bony fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*): indication for a higher impact of autocrine than of endocrine IGH-I. *Transgenic Research* 16, 479-489.

GH を過剰発現している数系統の遺伝子組換え魚が作出され、成長と妊性について解析されてきた。もっとも GH の影響に介在する成長を促進するホルモンである IGF-I についてはデータがほとんど無い。17 ヶ月齢の遺伝子組換えティラピア *Oreochromis niloticus* 成魚で、IGF-I と IGF 結合タンパク (IGFBPs) についてリアルタイム PCR、ラジオイムノアッセイ、in situ ハイブリダイゼーション、免疫組織化学、ラジオクロマトグラフィーを使って調べた。遺伝子組換えティラピアはコントロールに比べ、体長で 1.5 倍、体重で 2.3 倍大きかった。ラジオイムノアッセイでは、血清中 IGF-I レベルはコントロール (15.01 ± 0.75 ng/ml) より遺伝子組換えティラピア (6.22 ± 0.75 ng/ml) の方が低かった ( $P = 0.0012$ )。同様に、肝臓中の IGF-I は 4.2 倍高かった (遺伝子組換えティラピア 16.0 ± 2.21; コントロール 3.83 ± 0.71 ng/g、 $P = 0.0017$ )。コントロールの肝細胞中では認められず遺伝子組換えティラピアの肝細胞中では多くの IGF-I の免疫活性が認められた。

RT-PCR では IGF-I mRNA の発現は遺伝子組換えティラピア肝臓中で 1.4 倍高かった (10.51 ± 0.82 対 7.3 ± 0.49 pg/ $\mu$ g 全 RNA、 $P = 0.0032$ )。in situ ハイブリダイゼーションでは IGF-I mRNA が遺伝子組換えティラピアの肝細胞中により多く含まれることが認められた。遺伝子組換えティラピアの骨格筋で 2 倍の IGF-I mRNA の発現が認められた (0.33 ± 0.02 対 0.16 ± 0.01 pg/ $\mu$ g 全 RNA、 $P = 0.0001$ )。遺伝子組換えティラピアの肝臓と血清中で IGF-I 結合は上昇した。肝臓に含まれる IGF 結合タンパクの増加が IGF-I の抑制の原因になっているか、もしくは IGF-I の循環系への放出が肝細胞中の IGF-I のゆっくり

とした蓄積の結果となっているかもしれない。これらの結果は、遺伝子組換え魚の成長促進は骨格筋で見られたような、IGF-Iの肝細胞外でのオートクライン、あるいはパラクライン作用の増強によるかもしれないということを示している。

Kobayashi, S., Alimuddin, Morita, T., Miwa, M., Lu, J., Endo, M., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2007. Transgenic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) over-expressing growth hormone show reduced ammonia excretion. *Aquaculture* 270, 427-435.

養殖業の増大は養殖魚から排泄される高レベルの窒素による環境へのネガティブな影響を与える。遺伝子組換え技術によって、魚自身による窒素代謝の変化がこの公害問題を解決するかもしれない。GHはタンパク保持と吸収を増大することが知られている。その結果、アンモニアの排泄も減少することが考えられる。そこで、体中でGHを発現する遺伝子組換えティラピア *Oreochromis niloticus* を作出した。遺伝子組換えティラピアの餌料変換効率は非遺伝子組換えティラピア（兄弟）より35%も高かった。体重20gに達するまでに飼育期間は非遺伝子組換えティラピアが同じサイズで同じ餌料で飼育する場合の75%であった。遺伝子組換えティラピアによる全アンモニア-窒素排泄量は非遺伝子組換えティラピアの一生の間に排泄する量の69%であった。これらの結果は遺伝子組換え魚の飼育が養殖魚によって引き起こされる窒素公害を減少させることを示した。遺伝子組換え魚の飼育は「環境に優しい」養殖業を作る選択肢である。

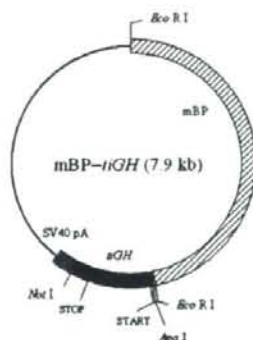


Fig. 1. Structure of the mBP-hGH construct. Shaded, black, and grey boxes represent mudlak  $\beta$ -actin promoter, tilapia hGH cDNA, and SV40 poly(A) sequences, respectively. START and STOP represent start and stop codons, respectively.

DNA construct: メダカ  $\beta$ -actin promoter+ティラピア GHcDNA

検出 primer: mBP-F1: 5' -ACGTTACCCGTCGAGTTGA-3'

GHR: 5' -TGAGTCGACCAATGCAACACATTTATTCACAGAT-3'

その他

Pohajdak, B., Mansour, M., Hrytsenko, O., Conlon, J.M., Dymond, L.C., Wright Jr., J.R., 2004. Production of transgenic tilapia with brookmann bodies secreting [desThrB30] human insulin. *Transgenic Research* 13, 313-323.

異種移植用細胞の作成に関する論文、省略

Alexander, E.L.R., Dooley, K.C., Pohajdak, B., Xu, B., Wright Jr., J.R., 2006. Things we have learned from tilapia islet xenotransplantation. *General and Comparative Endocrinology* 148, 125-131.

異種移植用細胞の作成に関する論文、省略

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全・安心確保推進研究事業）  
「モダンバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究」  
分担研究報告書（平成 20 年度）

モダンバイオテクノロジー応用食品の国民への普及啓発媒体や方法の検討

研究分担者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨

本研究は、モダンバイオテクノロジー応用食品の研究成果を、広く国民に普及するための啓発媒体や啓発方法をコミュニケーション研究の視点から検討する為に行われた。具体的には、研究成果の普及のためのわかりやすい資料とコミュニケーション技法について要点をまとめた。また、現在ある資料を分析して、よりよい表現にはどのようなものがあるのかを明らかにした。

研究協力者

吉川肇子

慶應義塾大学商学部准教授

A. 研究目的

本研究の目的は主として 2 点であった。(1)モダンバイオテクノロジー応用食品の研究成果を、広く国民に普及するための啓発媒体や啓発方法をコミュニケーション研究の視点から検討する。(2)研究成果の普及のためのわかりやすい資料とコミュニケーション技法について指針をまとめる。

B. 研究方法

まず、広範にコミュニケーション手法について、資料を収集し、これをまとめた。その上で、モダンバイオテクノロジーの情報提供に重要と考えられるポイントを抽出した。

さらに、実際に使われている説明資料を分析して、問題のある表現やわかりにくい表現を抽出し、その言い換えを提案した。

C. 研究結果

(1)コミュニケーション手法

Wiedemann(2008)によれば、コミュニケーションと、サイエンス・コミュニケーション、リスク・コミュニケーションとの関係は、マトリョーシカモデルで表現される(図 1)。



図 1 マトリョーシカモデル

このように、コミュニケーションの部分集合としてサイエンス・コミュニケーションがあり、さらにサイエンス・コミュニケーションの部分集合としてリスク・コミュニケーションがあるという考え方に立てば、サイエンス・コミュニケーションやリスク・コミュニケーションの前提として、一般的なコミュニケーションの知識や技術が問題とな



る。

具体的な手法については、次のようである。まず、情報の内容については、以下の点に注意しながら、資料を作成する。

#### ① 文章作成上の注意

文章の作成においては以下の点に注意する必要がある。

- ・最初に全体の概略を書くこと。
- ・結論から先に書く方がよい(反クライマックス順序)。
- ・受け手の関心が高い部分についてははていねいに記述する。
- ・科学的な知見が十分でない場合や、解明されていない場合はその理由を説明する。

＊表現の確実性：

推量形など不確定な文末表現は、無責任や不安感を抱かせるため注意が必要である。

＊丁寧さに関して：

内容や媒体によって丁寧さのレベルを変えること。

過剰な敬語を用いると、へりくだりすぎや、かえって見下したような

印象になる場合もあるため、注意が必要である。

口頭では文書よりも丁寧な表現の方が良い。

#### ② 文章表現

文章表現では以下の点に注意する必要がある。

- ・文書でしか使われないような用語は避ける。
- ・否定的な表現ではなく、肯定的な表現の方が良い(フレーミング効果)。

#### ③ 専門用語の解説

専門用語は使った直後に必ず解説を加える。

過度に専門用語を 사용하는場合に注意する。それに加えて、注意すべきなのは、その分野独自の略語の使用である。特に、使用頻度の高い用語については、略語を用いることがしばしばあり、使っ

ている本人は気がつかないことがある。

また、専門用語でなくても、当該分野で頻繁に使われている熟語も、専門外の人びとが聞くとすぐには理解できないこともあるので注意が必要である。

#### ④ リスク比較

リスク比較は情報の受け手の理解を助けただけでなく、意図的にリスクを過小に示していると捉えられる場合もあるため、やむを得ない場合を除いては用いない方が望ましい。比較する必要がある場合には、同じ物質に関する経年変化は比較的許容される。

また、いわゆる Q&A (質問と回答) を作成するときの主な注意点は、「質問の選択と配列」「発問と回答の一致」の 2 点である。

・「質問の選択と配列」

「情報の受け手が関心をもっている内容」、「当該の問題を理解する上で必要となる知識」の 2 つの視点から発問を考える。その際、専門家からの一方的な知識の提供にならないように注意する。質問の配列は、重要な問から先に並べていくこと。

・「発問と回答の一致」

回答の最初の一文で、まず答えるようにすること。

上記の手続きに基づき、資料を作成したら、公表する前に資料の見直しをすることが必要である。

- ・資料の作成後は、「関心事項にもれがないか」「わかりやすいか」の 2 点に注意し見直す必要がある。この時に、外部の関係者を交えて行うと良い。

口頭で話すときの注意として、次のようなコミュニケーションの基本的な技術に注意する。コミュニケーションの基本的な対応技術は、コミュニケーションを成功に導くために特に重要である。以下に、コミュニケーションに求められる対応方法とその人物選定について記す。

### ①コミュニケーターの聞き方

・謙虚さが必要である。専門家が非専門家を生徒とみなすような啓蒙的なコミュニケーションでは、コミュニケーションは上手くない。

・相手がどのような関心を持っているかについて把握しなければならないため、耳を傾けて聞く傾聴能力(active listening skills)が重要である。

・「はい」か、「いいえ」で答えられるような閉じた質問(closed question)ではなく、相手が自由にこたえることができる、開かれた質問(open question)を行うのがよい。そうすることで、相手が何を考えているかについての情報を得やすくなる。

### ②コミュニケーターの話し方

・相手の言うことを否定しないことが重要である。その際、専門用語をなるべく使わないようにすることと、身振り手振りなどの非言語的コミュニケーションに配慮する。

### ③コミュニケーターの選定

身体的な魅力や親しみやすさといった、送り手の魅力も重要である。また、専門的知識があるか、もしくは自ら信じることを述べているかという点も、送り手の信頼性を高める。

さらに、バイオテクノロジーにおいては、リスクを確率的に表現する場合があるが、その場合にも、次のような点を考慮することが必要である。

確率は、数字で表すのが通常であるが、言葉で表す場合もある。数字による表現は、一般の人にはわかりにくい場合があるからである。言葉によって表現する際には、確率の評価の順序は副詞と文末表現のバリエーションに対応しているといった実験結果が得られている(吉川・菅原・岡本, 1999)。したがって、確率を言葉で表現する場合には、次のような点に配慮が必要である。

①中程度の確率の場合には、受け取り方に個人差が現れやすい。

②確率的な予想がはずれた場合には、話し手の信頼性が揺らぐ可能性がある。

上記のような問題を避けるため、確率を伝える際には、数字と言語的説明を併記する他、数字を

示す代わりに、確率を図で示したものと言語的説明を併記する方法も考えられよう。

### (2)バイオテクノロジーの説明資料に見る改善点

前述のようなコミュニケーション技術をもとに、現在使われている発表資料を分析した。ただし、明らかに専門用語として意識できるものは、説明の際注意をされると考えられるので、ここでは列挙しない。

①耳で聞いてわかりにくい単語(したがって、フリガナをふるか、初出の際に説明をした方がいいもの)

a.通常使われる日本語であるが、話し言葉として聞くと直ちにはわかりにくいもの

動向、導入、既存、同等、施行、公示、意図的、非意図的、相違、含量、上市、残存、準用、考慮、定着性、個別、多岐、欠失、作出、勘案、間接的、相違、差異、挿入、根拠、当該、事項、勘案、食用、由来、係る、など

b.当該分野でしばしば使われるが、一般にはそれほど使われないために、漢字が思い浮かびにくいもの

用量、食味、検出法、不稔、稔生、種子植物、交雑性、形態、宿主、産生能、耐性、発現、組成、近傍配列、慢性毒性、供与体、人工胃液、患者血清、経口負荷試験、腸管、形質、毒性学、下限(上限)、食経験、代謝経路、性状、急性、亜急性、など

c.一部の英単語はわかるために聞き逃しがちだが、意味のとれないカタカナ語

オープンリーディングフレーム、アレルギー性、アレルギー誘発性、既知アレルギー、セルフクローニング、ナチュラルオカレンス、など

d.個別の単語は理解可能だが、漢字が長く続くために、理解が困難になる単語

遺伝的安定性、構成成分、生存能力、有害生理活性物質、など

これらの用語のうち、特に a.に分類されるものは、和語へのいいかえをすることで、聞き手にわ

かりやすくなる。たとえば、次のような言い換えが考えられよう。

動向→動き

既存→すでにある、これまでもある

相違→ちがいがい

残存→残る

## ②図表および箇条書き項目の配置

資料を読むときの人間の目の動きについては、認知心理学の研究から明らかになっている。この点を考慮して項目の配置に注意する必要がある。

たとえば、図2のような階層構造の示し方であると、2つの点からわかりにくい。第1は、左から右へ視線が動くので、縦に配列してあるのは、読み方としては不自然であるということである。第2に、2つの系列が縦に並んでいるため、右の系列から読み出しがいいのか、左の系列から読み出しがいいのかがわかりにくいということである。左右が並列であれば、どちらから読んでもよいのであるが、読み手を迷わせるような配置でない方がよい。

図の2は、同じ図を横に配置したものである。このような配置の時、読み手は、上の系列をまず右へ読み、次に下の系列を右へ読むので、読む順について迷うことがない。どちらから読み始めてもよい並列な系統であっても、このような配列の方が理解しやすくなる。

もちろん、配列が並列でなく、順序がある場合は、その順序に沿った配列とする。配置としては、左隅から読み出すので、最初に読んで欲しい項目を左隅に配置する。



図2 図の配置の例

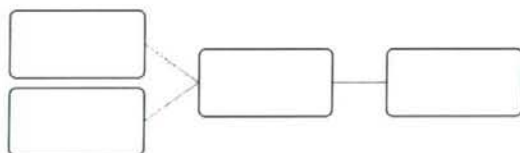


図3 図2の配置の改善例

## D. 考察

モダンバイオテクノロジーに特化したコミュニケーション技法の検討はまだ十分ではないが、使用されている用語の使い方などに、問題があることが見いだせた。今後は、これらの用語の言い換えや、説明の際にいちいち用語を解説しなくてもいいような、簡単な用語解説集の作成などが必要であると考えられる。

また、図が多用されている資料が多かったが、項目の配置にもヒトの目の動きに配慮することが必要であると考えられた。

## E. 結論

考察に基づき、今後の改善が望まれる。



## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 引用文献

吉川 肇子・岡本 真一郎・菅原 康二 1999 リスクの生起確率の言語的表現 日本リスク研究学会誌, 11, 67-74.

Wiedemann, P. (2008) Recommendations for communicating controversial risks: How much are they based on sufficient evidence. Paper presented at the International Workshop of Communicating Controversial Risk. Munich Re, November, 4, 2008

## 遺伝子組換え動物の安全性評価に関する研究

研究分担者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

### 研究要旨

平成 20 年度は、遺伝子改変（GM）ニワトリを実験モデルとして、ポストゲノム手法による安全性評価（小関良宏研究員・分担）、アレルギー試験（手島玲子研究員・分担）及び平成 19 年度にニワトリ胚で実施した外来遺伝子検出系を実際の可食組織に適応させ、簡易検出系の評価試験を行った。検出する外来遺伝子には、ニワトリ胚性幹（ES）細胞の選抜に利用するピューロマイシン耐性遺伝子（*Puro<sup>r</sup>*）とレポーター遺伝子として利用する緑色蛍光蛋白質遺伝子（*EGFP*）を選択した。遺伝子導入 ES 細胞から GM ニワトリを作出後、可食部位である肝臓、胃、筋肉、表皮を採取し、一部は研究分担者へ供与し、各種実験に供試していただいた。また本研究では同組織からゲノム抽出を行い、昨年度実施した方法を一部改変して外来遺伝子の検出を行った。その結果、*EGFP* は first PCR から目的の遺伝子が検出されたが、*Puro<sup>r</sup>* は検出のためには nested PCR（2 回の PCR の操作が必要）が必要であることがわかった。次に煩雑なゲノム抽出の操作なしに目的の外来遺伝子を検出する（簡易法）方法の開発を行い、S 社の PCR 緩衝液と N 社の DNA polymerase を組み合わせることで、非常に少量の組織溶解液もしくは組織そのものを用いて、2 つの外来遺伝子が first PCR で検出できることがわかった。この手法は、実際の検疫などの現場で非常に有効な手法となることが期待される。

### 協力研究者

堀内浩幸（国立大学法人広島大学・大学院生物圏  
科学研究科 助教）

小関良宏（国立大学法人東京農工大学・工学部  
教授）

手島玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

### A. 研究目的

遺伝子組換え食品の安全性評価は、次世代の国民の食の安全性を確保する上で重要な研究課題であり、既に遺伝子組換え植物は、世界的な流通規模となっており、様々な対策が図られ、またリスクコミュニケーションが進められている。一方遺伝子組換え動物では、水域における魚類において流通の許可待ちの段階まできており、その対策が急がれている。陸域の遺伝子組換え動物は、現在研究段階であるものが多いが、技術的な開発は既に完成の域に達しており、今後 10 年以内には、

遺伝子組換え動物の産物が食品として流通することが予想される。既に医薬品では、EU において遺伝子組換えヤギにより作製されたトロンピン（血液凝固因子）が認可を受けている。また平成 19 年度の CODEX 委員会では、「組換え DNA 動物由来食品の安全性評価ガイドライン」に関し、抗生物質耐性マーカー遺伝子の利用は禁止する提言が成されており、これに対応した安全性と検出系の評価方法の確立が必要である。そこで本研究では、魚類の次ぎに遺伝子改変技術により、食品・医薬品市場を睨んだ広範な商品開発が予想されるニワトリにおいて、それらの産物の安全性評価及び検出系を構築することを目的とし、昨年度構築した検出系をもとに、本年度は実際に GM ニワトリの可食部位からの外来遺伝子検出系の構築を行った。

## B. 研究方法 および C. 結果

### 1) 高感度検出に適した DNA polymerase の選択

平成 19 年度には、遺伝子導入 ES 細胞およびその ES 細胞をレシピエント胚へ移植し発生させた遺伝子導入胚や組織を用いて、外来遺伝子である *EGFP* や *Puro<sup>r</sup>* の PCR による検出条件の検討を行った。検出のためのプライマーは図 1-1 に示した。本年度は、両遺伝子が導入された GM ニワトリから可食部位を採取し、実際に構築した検出系がうまく機能するかどうかを試験するとともに、検出系の最適化を行った。まず正確で高感度検出が可能な DNA polymerase を選択することを目的に 5 種の市販の DNA polymerase を用いて、ゲノム DNA なしの条件下で *EGFP* 検出用プライマーによる非特異増幅の有無をチェックした。その結果、図 1-2 に示したように全ての DNA polymerase において nested PCR を行うことで非特異的なバンドが複数検出されることがわかった。この原因を解明するために、ゲノム DNA のコンタミネーションの有無、出現するバンドの塩基配列の解析等を行ったが、ゲノム DNA のコンタミネーションはなく、また解析した塩基配列は *EGFP* や *Puro<sup>r</sup>* の配列とは全く異なることがわかった（結果はしめていない）。この非特異的なバンドが出現する理由については、明らかにすることができなかったが、内因性の遺伝子の混入やプライマーダイマーの形成などが疑われた。そこで内因性の混入を排除しかつ高温条件下でのみ polymerase が活性化される A 社の DNA polymerase を供試した。その結果、図 1-3 に示したように、*EGFP* や *Puro<sup>r</sup>* の PCR, nested PCR の条件下でも非特異的なバンドは検出されず、陽性対照に使用した *EGFP* vector と遺伝子導入 ES 細胞

ゲノム DNA を鋳型にした場合のみ、目的のバンドを検出できることがわかった（nested PCR の結果は示していない）。

### 2) A 社の DNA polymerase の最適化

A 社の DNA polymerase は、高純度に精製された DNA polymerase でありホストバクテリア由来 DNA の混入が少なく、また 95℃以上で加熱することで polymerase が活性化されるため、非特異的なプライマーのアニーリングを抑制できる。そのため PCR において非特異的な増幅が良く抑えられることで知られている。本研究でも、1) の *EGFP* や *Puro<sup>r</sup>* の PCR, nested PCR の条件下でも非特異的なバンドは検出されなかった。そこで次に、さらに特異性を高め、また同時に簡便化（検出の高速化）を計った。*EGFP* 増幅用のプライマーの指摘アニーリングを 57-66℃の間で検討したところ、66℃でも十分な *EGFP* の増幅を確認した（図 2-1）。そこで次にアニーリング反応と伸長反応を 67℃で同時に行う two step-PCR を行った。その結果、遺伝子導入 ES 細胞ゲノムを鋳型に行った two step-PCR で 10 ng の鋳型量からも十分な増幅を示すバンドが認められた（図 2-2）。また遺伝子導入を行っていない ES 細胞のゲノムを用いた場合には、非特異的な反応は認められなかった。さらに同様に、*Puro<sup>r</sup>* の PCR による条件の最適化も行った。その結果、*Puro<sup>r</sup>* の増幅においても 66℃でも十分な増幅が確認にされ、two step-PCR が適応できることを確認した（結果は示していない）。

### 3) 遺伝子導入胚及び GM ニワトリ可食組織からの外来遺伝子の検出