

FIG. 6. IL-6 released from PP CD11c<sup>+</sup> cells. MACS-separated CD11c<sup>+</sup> cells ( $5 \times 10^4$  cells/well) were stimulated with recombinant *L. casei* cells (bacteria/CD11c<sup>+</sup> cell ratios, 20, 10, and 5) (a) or culture supernatant (5%, 0.5%, and 0.05% diluted in RPMI 1640 medium) (b). After 24 h of incubation, samples were collected and released IL-6 was detected by ELISA. The results are representative of three separate experiments; the values are means and SD. Solid bars, KJ725 cells/supernatants; open bars, LCN cells/supernatants.

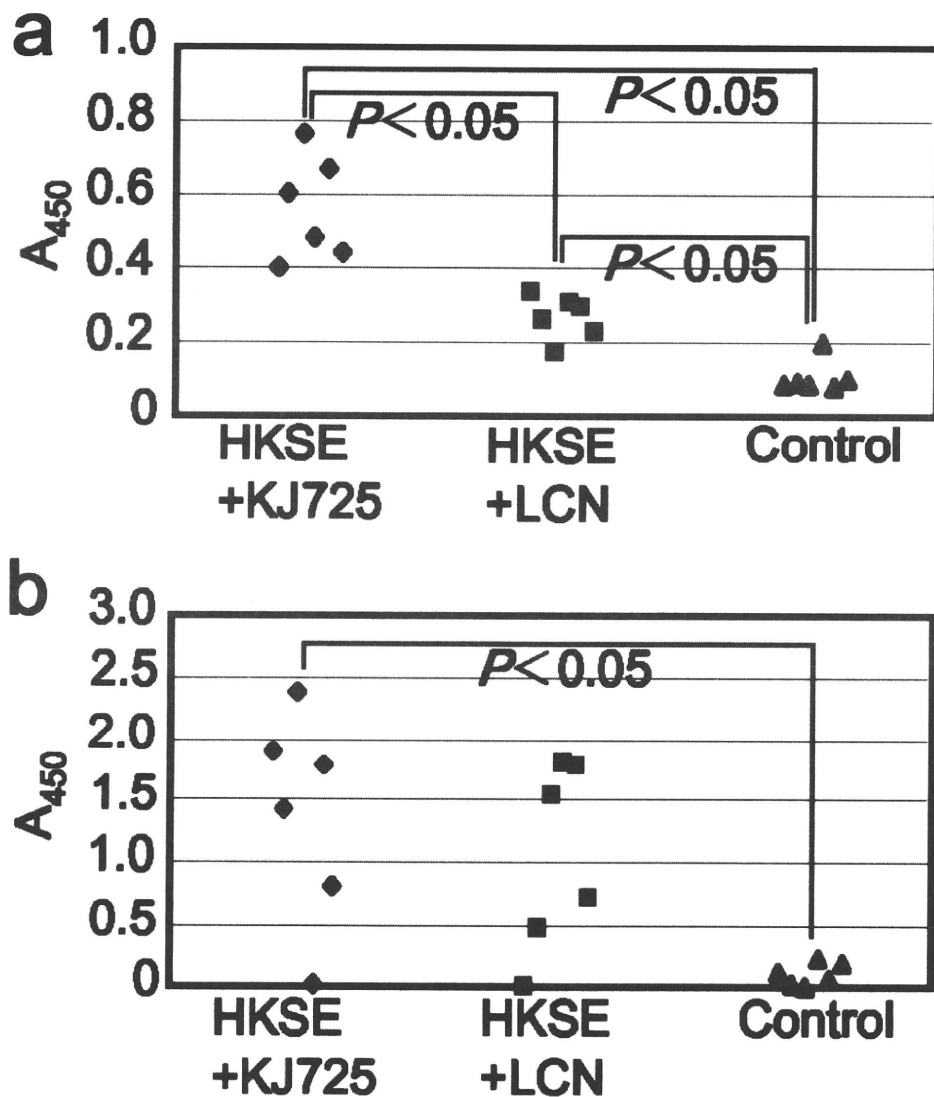


FIG. 7. SE-specific antibody production induced by HKSE with either KJ725 or LCN. Anti-SE IgG in 100-fold-diluted serum (a) and anti-SE IgA in 50-fold-diluted cecum lavage fluid (b) were detected by ELISA. Each value represents the absorbance at 450 nm ( $A_{450}$ ). The immunization groups are shown at the bottom. Statistical significance was accepted at  $P < 0.05$ . The control was a group that received MRSC medium alone.

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「第 3 世代モダンバイオテクノロジー応用食品等の安全性確保と

リスクコミュニケーションに関する研究」

分担研究報告書（平成 22 年度）

## 遺伝子組換え魚文献検索に関する研究

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

2009 年 1 月に公表された GM 動物の取り扱いに関する産業界向けガイダンスによって AquaBounty Technologies 社は不凍タンパクプロモーターの下流に成長ホルモン cDNA をつなげた配列を大西洋サケに導入した GM 大西洋サケを食品として出荷できるように FDA に申請した。FDA はこの申請に対し、2010 年 9 月に公開の科学諮問委員会とこの GM 大西洋サケの表示に関する公聴会を開催した。FDA はこの会議に提出された資料の中で、GM 大西洋サケに関して、特に問題は無いと判断しており、同年 11 月までパブリックコメントを求める期間を設け、これらの意見を元に最終判断をする状況になっている。

### 協力研究者

名古屋博之（独立行政法人 水産総合研究センター  
養殖研究所 生産技術部 育種グループ）

### A. 研究目的

前年度に引き続き、海外における遺伝子組換え魚介類の開発状況や研究情報を文献検索、インターネットおよび特許等から調査し、我が国での安全性評価基準作成の一助とする。

### B. 研究方法

遺伝子組換え魚介類に関する情報を文献データベース、インターネット、特許情報、新聞等を用いて調査した。調査は遺伝子組換え大西洋サケを食品として申請している AquaBounty Technologies 社のホームページを中心に調査し、2009 年に報告された文献のうち、組換え魚類について検索を行った。また、これまで発表されている遺伝子組換え大西洋サケについて整理した。

### C. 研究結果

本年度は遺伝子組換え大西洋サケに関する公開の科学委員会と遺伝子組換え大西洋サケに由来する食品の表示義務についての公聴会の開催が一番

のトピックであった。FDA は 2010 年 9 月 19 日から 21 日にかけて公開で AquaBounty Technologies 社が開発し、食品として申請している AquAdvantage Salmon (AAS)（成長ホルモン遺伝子を導入した GM 大西洋サケ）に関する科学諮問委員会と AquAdvantage Salmon 由来の食品のラベル表示に関する公聴会を開催した。また、11 月 22 日まで文章による意見を提出することが可能であった。

この会議において、全てではないが、FDA が GM 大西洋サケに関して開発会社にどのような資料を請求していたか不明であった項目が明らかになった。

#### 1. FDA は GM 動物をどのように評価したのか。

第一に、FDA は構築物がどのように作られたか、またそれが、その魚を食べる人間や動物に非健康的な害の危険をもたらす可能性のあるウイルスや他の有機物からの DNA を含んでいないかどうかに関するデータと情報を調査する。

第二に、FDA は開発会社が提出した研究を評価し、組換え DNA 構築物が動物に組み込まれたときに何が起こるか、また数世代にわたってその構築物がどのように振る舞うかについて調べる。

第三に、FDA は「表現型特性評価」と呼ぶ評価法を実施して、組換え DNA 構築物が GM 動物として作られた系統にとって安全かどうかを判断する。FDA は実際の GM 動物を数世代にわたって特性評価した調査結果を検討することによってそれを遂行する。

第四に、FDA は「耐久性評価」と呼んでいるものを実施する。これは将来生産される GM 動物が、事前承認検討の一環として FDA が評価している当該の GM 動物と同等であることを確実にするために開発会社が同意する計画書を検討するものである。

第五に、GM 動物が食品の材料として用いられる場合、FDA は当該の GM を食べても安全かどうかを評価する。この評価は組換え DNA 構築物と動物の健康を調査した申請書の一部として収集された情報に依拠する。

第六に、FDA は提出された GM 動物を育てる条件と関連する環境評価を審査する。承認プロセスの一環として当局は「国家環境政策法 (NEPA)」の要件を満たす必要がある。

最後の第七段階では、開発会社は GM 動物に対する申し立てを裏付けるために書類を提出する。

(医薬品に定められている従来の項目ではこれは「有効性」とされている)。成長を速める目的で作られた動物については、FDA は、その GM 動物が従来の対応物よりも速く一定の大きさや体重に実際に到達するかどうかを示すデータを評価する必要がある。

以上述べた 7 項目について開発会社に資料を請求し検討を行った。

## 2. AquaAdvantage Salmon の製品定義とは。

開発会社が明らかにしている GM 対英洋サケの定義は次のようなものであった。

“E0-1 $\alpha$  系列の  $\alpha$  遺伝子座に安定に取り込まれた  $\alpha$  型 opAFP-GHc2 遺伝子構築体の単一コピーを持つ三倍体の大西洋サケ (学名: *Salmo salar*) のことで、物理的に封じ込められた生産施設におけ

る三倍体・半接合・全雌魚養殖のための発眼卵として生産され、その個体群は、現在の養殖法における水温度特性/飽食給餌により、給餌開始から 2700 度日以内に平均体重が 100 グラムにまで成長し、さらにその殆どが 100 グラムを上回る。”

本生産物は、商用・食用大西洋サケの陸上養殖向きである。今回の評価において、AquaAdvantage Salmon の持つ潜在的環境リスクは、以下に示す特定の生産/利用環境において検証された。

- ① カナダのプリンスエドワード島にて発眼卵生産
- ② 発眼卵をパナマへ出荷
- ③ パナマ高地にて養殖
- ④ パナマにて加工
- ⑤ 加工済みの魚をアメリカ合衆国に出荷

## D. 考察

GM 大西洋サケを開発した AquaBounty Technologies 社は 1994 年からずっと食品として GM 大西洋サケを出荷できるように FDA に求め続けてきたが、FDA は食品としてでなく、動物医薬品として扱ったため、今まで曖昧な状況におかれてきた。それが 2009 年 1 月に公表された GM 動物の取り扱いを定めた産業界向けのガイダンスに始めて食品を想定した GM 動物についての取り扱いが載り、今回開催された公開科学諮問委員会につながったと思われる。

今回の申請のポイントとして、GM 大西洋サケの定義として、成長がよいことだけでなく、養殖場所等も定義にはいつていることである。このことから、飼育条件・飼育場所が異なってくると、あらたに申請をし直さなければならず、このことがすぐに他の地域で GM 大西洋サケが養殖されるわけでは無いという根拠になる。

GM 大西洋サケを用いた論文を調べる限り、確かに成長は良いものの、その稚魚期に食欲に関する食欲さのため、捕食者が存在する場合でも摂餌行動を示し、生存率が低いことを予想させるデータはあるものの、3 倍体加処理が 100%成功するわけ

では無いことを開発会社も認めていることから、飼育条件に関してはより一層の厳しい条件が求められる。

#### E. 結論

FDA は今回 AquaBounty Technologies 社の提出した資料に、特に問題は無いと判断しており 11 月 22 日までパブリックコメントを求める期間も終了したことから、近々申請に対する判断が下されると思われる。申請が認可された場合でも、日本で GM 大西洋サケが養殖されることは考えられないが、製品として輸入されることは十分考えられる。今後はアメリカにおける GM 大西洋サケの表示などに関する情報を調べると共に、非意図的に混入した場合の検査体制の確立等が求められる。

#### 参考インターネットホームページ

1. A/F Protein 社 ; <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. 組換え魚に反対している消費者団体  
The center for food safety  
<http://www.centerforfoodsafety.org/home.cfm>

#### 組換え体に関する特許情報

4. Isolation and Characterization of an Actin Gene from Abalone  
U.S. Patent Number 5,675,061  
Powers *et al.* Oct. 7, 1997
5. Lycopene Cyclase Gene  
U.S. Patent Number 5,792,903  
Hirschberg *et al.* August 11, 1998
6. Transgenic Salmonid Fish Expressing Exogenous Salmonid Growth Hormone  
U.S. Patent Number 5,545,808

- Hew *et al.* August 13, 1996
7. Transgenic Fish and Vectors Therefor...  
U.S. Patent Number 5,998,697  
Devlin, Robert H. Dec. 7, 1999
8. Transgenic fish and a method of harvesting islet cells therefrom  
U.S. Patent 6,015,713  
Wright Jr. *et al.* Jan. 18, 2000
9. Cell-lineage specific expression in transgenic Zebrafish  
U.S. Patent Number 6,380,458  
Lin Shuo June 9, 1997
10. Expression vector of a mud loach growth hormone gene  
U.S. Patent Number 6,372,959  
Kim, *et al.*  
April 16, 2002
11. Transgenic tilapia comprising a humanized insulin gene  
U.S. Patent Number 6,476,290  
Wright, Jr., *et al.*

2011 年 9 月に開催された FDA 公聴会における資料をみられるホームページ

<http://www.fda.gov/NewsEvents/PublicHealthFocus/ucm224089.htm> の中の、

12. Briefing packet for aquadvantage salmon veterinary medicine advisory committee (公開科学委員会に提出された遺伝子組換え大西洋サケの安全性について調べた結果のファイル)
13. Environmental assessment for aquadvantage salmon (Aqua bounty technologies, Inc.) (遺伝子組換え大西洋サケの環境アセスメントを行った結果のファイル)

## — レビュー —

## 遺伝子組換え大西洋サケに関する最近の状況

名古屋博之・岡本裕之・正岡哲治・荒木和男 (水総セ養殖研)  
佐藤俊平・伴 真俊 (水総セさけますセ)

## Current Aspect on the Transgenic Atlantic Salmon

Hiroyuki NAGOYA<sup>\*1</sup>, Hiroyuki OKAMOTO<sup>\*1</sup>, Tetsuji MASAOKA<sup>\*1</sup>,  
Kazuo ARAKI<sup>\*1</sup>, Shunpei SATO<sup>\*2</sup> and Masatoshi BAN<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency

<sup>\*2</sup> National Salmon Resources Center, Fisheries Research Agency

## Abstract

The Food and Drug Administration of the United State issued a final guidance for industry on the regulation of transgenic animals in January, 2009. This guidance is to explain the process that transgenic animal producers should register for commercialization of products. A company in the United State is applying to FDA for their transgenic Atlantic salmon as food. We touch upon the situation in the application with transgenic Atlantic salmon and offer the information about the article with transgenic Atlantic salmon.

(accepted May 27, 2010)

## 1. はじめに

米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA)・動物薬センター (Center for Veterinary Medicine; CVM) は2010年1月に産業界向けガイダンスとして「遺伝性の組換えDNA構成体を含む遺伝子操作動物についての規制」(Guidance for Industry Regulation of Genetically Engineered Animals Containing Heritable Recombinant DNA Constructs) を発表した。これは連邦食品医薬品化粧品法の新規動物医薬品条項によって、遺伝子組換え動物の開発者が提出した申請の処理に当たっている上記機関がバイオファーム動物に由来する調剤や他の医療品を規制するFDAの他のセンターと、チェックが相補的で不必要に重複しないように緊密に協働して、遺伝子組換え動物およびその製品の生産者と開発者のために手続き等を

明確化することを目的として発表されたものである。

このガイダンスの中で遺伝子組換え動物は利用目的により、(1)生産性や食品の質的特性の向上(例:環境に有害な排泄物が少ない豚、成長を迅速化した魚)、(2)動物の健康増進(例:疾病耐性の強化)、(3)ヒトの医療用の製品(例:医薬品、移植用組織。こうしたGE (Genetically Engineered) 動物は「バイオファーム (biopharm)」動物とも呼ばれる)、(4)動物のヒトとの触れ合いを高める(例:低アレルギー性ペット)、(5)ヒトの疾病のための動物モデルの開発(例:豚を利用した心臓血管病用のモデル)、(6)工業品や消費財の製造(例:多用途の繊維)の6つの範疇に分類されている。この中で、今まで動物医薬品として扱われ食品として認識されていなかった遺伝子組換え魚が(1)の例えとして、成長を促進した魚として生産性や

連絡先: 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1 (独)水産総合研究センター 養殖研究所 名古屋博之  
Tel: 0599-66-1830 Fax: 0599-66-1962 E-mail: hnagoia@affrc.go.jp

食品の質的特性の向上、という項に分類され、初めて食品として成長ホルモン遺伝子導入魚が生産されると認識される状況になった。

これを受けて、今までも食品として遺伝子組換え大西洋サケを開発してきたアメリカとカナダに本拠を置く AquaBounty Technologies 社は FDA・CVM が求めている資料を提出し、申請を進めている。FDA は途中経過は公表しない、としているので、審査結果が判明するまで我々外部の人間には審査状況を知ることはできないが、食品として認可された場合に日本に無関係というわけにはいかない。そこで、本報では遺伝子組換え大西洋サケに関して、これまでの開発状況や、それを用いた論文等について整理し、遺伝子組換え大西洋サケに関する情報を提供する。

## 2. 大西洋サケ (Atlantic salmon)

遺伝子組換え大西洋サケの話題に入る前にまず、大西洋サケについて、その概略を説明する。

大西洋サケはサケ科のうちの一つで、ブラウントラウト *Salmo trutta* に最も近い。本来の分布域は MacCrimmon and Gots<sup>1)</sup> によれば北大西洋に面する沿岸流域で北米側ではハドソン河 (北緯41度) から北の大西洋沿岸に沿う河川および海域でフレーザー川 (北緯56度40分) に至るまで生息していた。それより北の一部にも個体群が存在していた。ヨーロッパ側では南はポルトガルのドゥロ川 (北緯41度) からアイスランド (北緯66度)、バレンツ海およびカラ海 (北緯70度、東経83度) に分布していたが、現在ではフランス、スペイン、ポルトガルの川では絶滅しているか、非常に衰弱している。また、エルベ川、ライン川およびバルチック海に注ぐ川ではもはや生息していない。天然魚の生息水温は2~9℃とされている<sup>2)</sup>。成熟年齢 (雌は3歳以降) に達した魚は、春季あるいは秋季に母川へ遡上して10~11月に産卵する。成熟魚のなかには複数年に亘って産卵する個体もいる<sup>3)</sup>。本種は通常2~4年の河川生活を送った後、スモルト化して海に降りるが<sup>4)</sup>、一生を淡水で過ごす群もいる<sup>5)</sup>。幼稚魚は体側に8~11個のパーマークと赤点を有するが<sup>6)</sup>、スモルト化すると体色が銀色になりパーマークは消える。

日本における飼育例は1980年にソ連ポリシャヤ川産の発眼卵を83年まで毎年、青森県に導入し、飼育試験を行った<sup>6-15)</sup>。現在、大西洋サケを飼育している施設としては北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所、札幌市豊平川さけ科学館、標津サーモン科学館がある。(独)水産総合研究センター養殖研究所でも七飯淡水実験所から分譲を受け、研究目的で飼育を始めている。

## 3. 遺伝子組換え大西洋サケの開発

Hew *et al.*<sup>16)</sup> によれば、カナダ大西洋沿岸地域の大部分における冬期の海洋環境は、水温が零度あるいは氷点下になる (0℃~-1.8℃) という特色があって、サケ科魚類およびその他多数の商業的に重要な魚類は、氷点下の水温で生存できない。従って、海面生質養殖は、結氷の発生が稀なカナダ東海岸の南端部に位置するニュー・ブランズウィック州沿岸のバサマクウォーディ湾にある比較的小規模な複数の地区に限って実施されていた。Hew *et al.*<sup>16)</sup> は長年に亘って魚類の凍結抵抗性メカニズムを研究していたことから、新生産業の需要に応えるのが望ましいと考え、1) 不凍タンパク質遺伝子を与えることにより凍結耐性のサケを生産すること、そして、2) 成長ホルモン遺伝子を導入することにより越冬が不要となるよう成長速度を促進することを考えた。

### 3.1 不凍タンパク質

DeVries *et al.*<sup>17)</sup> による研究によって当該不凍液がポリペプチドであることが実証された。これらのタンパク質は主に肝臓で合成され、血液および細胞外隙間に排出されることにより、海水の凍結温度 (-1.8℃) と同程度の低温においても効果的に魚類を凍結から保護するものである<sup>18)</sup>。すでに数種類の魚種から不凍タンパク (Antifreeze protein; AFP) がクローニングされている。ウィンターフラウンダー *Pleuronectes americanus* (I型) にはおよそ30個から40個の (遺伝子) コピーが存在し、ケムシカジカ *Hemirhamphus americanus* (II型) には12個から15個のコピーがあり、ニューファンドランド・ゲンゲ *Macrozoarces americanus* (Schneider) (III型) には150個のコピーが存在する。これら AFP 遺伝子の多くは、遺伝子群として縦列反復している<sup>18)</sup>。

### 3.2 AFP遺伝子と大西洋サケへの遺伝子導入

Fletcher *et al.*<sup>19)</sup> はウィンターフラウンダーからクローニングした AFP 遺伝子を大西洋サケに遺伝子導入した。1985年に遺伝子導入した大西洋サケ324匹のうち10匹に関しては、血液から抽出した DNA に不凍タンパク質遺伝子の存在が認められ、AFP 遺伝子導入の全体的な導入率は約3%であった。1988年にこれらの個体を野性型雌と交配させて F1 を作出した<sup>20)</sup>。F1 の中で導入遺伝子が確認された個体の割合は17%であった。このうちの F1 雄が成熟し野性型雌と交配した結果、F2 では約50%の個体から導入遺伝子が確認された。

AFP 遺伝子導入大西洋サケの AFP を調べた結果、

前駆体 AFP で成熟 AFP は存在しないことが判明した。これは大西洋サケが前駆体 AFP を成熟 AFP に変換するための酵素を持っていないことが原因と思われた。ただし、前駆体 AFP でも不凍作用の60%から70%の働きを持つことがわかっている<sup>21)</sup>。したがって、遺伝子組換え大西洋サケが凍結耐性を得るのに十分な AFP を生成しないことがわかって、その後の研究として、プロモーター活性のより強いものを利用するか、タンパク質工学を用いて大西洋サケで AFP をコードする遺伝子を設計することを考えている。

### 3.3 大西洋サケへ成長ホルモン遺伝子の導入

次に、成長ホルモン遺伝子を導入した大西洋サケについて述べる。導入遺伝子はゲンゲ Ocean pout; *Macrozoarces americanus* の AFP プロモーター (opAFP) にマスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha* 成長ホルモン (GH) cDNA をつなげた opAFP-GHc と GH 領域に cDNA とゲノム DNA をつなげたキメラ GH を作って、その配列を opAFP プロモーターにつなげた opAFP-GHf を使用した。この2つの構築物は両者とも大西洋サケの成長を促進することが確認された。遺伝子導入個体の確認は両者とも2~3%であった<sup>20)</sup>。これらの個体から F1 を作出したが、これらの個体を用いて導入遺伝子を調べた結果0~18%の個体で確認でき、改めて、遺伝子導入個体が生殖細胞モザイクであることが示された。これは導入された DNA が組み込まれる速度が遅いことを反映するものと推定されている<sup>22)</sup>。Fletcher ら<sup>23)</sup> によれば、遺伝子組換え大西洋サケに関する作出の経緯は Table 1 のようになる。

今回 FDA に食品として申請されている遺伝子組換え大西洋サケは1989年に初めて作出された。マイクロ

インジェクションによって遺伝子導入された個体のうち、2~3%の個体に導入遺伝子が確認されたが、これらは導入遺伝子が組み込まれた細胞と組み込まれていない細胞を持つモザイク個体である。3年後に成熟した雄と野生型の大西洋サケを交配した結果19%の個体に導入遺伝子が検出され F1 が作出された。更に3年後に F1 (これらの個体ではモザイク個体ではない) を用いて野生型の雌と交配して F2 を作出している。この場合、半分の精子に導入遺伝子が入っていることが期待されるが、実際に導入遺伝子個体の割合を調べても56%と理論値と一致している。このような経過で作出された遺伝子組換え大西洋サケであるが、今までにこれらの遺伝子組換え大西洋サケを用いていくつかの論文が発表されているので、次に、これらの論文の紹介とその要旨を示したい。

### 4. 遺伝子組換え大西洋サケに関する論文

遺伝子組換え魚類に関する論文はすでに多くの報告がある。ここでは現在食用として FDA に申請している遺伝子組換え大西洋サケを用いた論文について取り上げ、紹介する。

#### 1) 全て魚類由来の成長ホルモン遺伝子構築物の使用による遺伝子組換え大西洋サケの成長促進<sup>24)</sup>

マスノスケの成長ホルモン cDNA クローンと連結したゲンゲの不凍タンパク質遺伝子 (AFP) プロモーターを使用し、「全魚類」成長ホルモンキメラ遺伝子構築物を開発した。卵門を通して大西洋サケの受精卵にマイクロインジェクションし、遺伝子組換え大西洋サケを作出した。特別なオリゴヌクレオチドプライマーを使用した PCR 反応により組換え遺伝子の存在

Table 1. The records of the production year and their inheritance rate in transgenic Atlantic salmon by Fletcher *et al.* (2000)<sup>23)</sup>

Transgene	Production Year	Generation	Cross	Transgene	
				Observed (%)	Expected (%)
AFP* <sup>1</sup>	1985	P1		3	
	1989	F1	Wild × P1	17	
	1990	F2	Wild × F1	51-54	50
	1992	F3	Wild × F2	52	50
	1992	F3	F2 × F2	69-77	75
GH* <sup>2</sup>	1989	P1		2-3	
	1992	F1	P1 × Wild	19	
	1995	F2	F1 × Wild	56	50
	1998	F3	F2 × Wild	53	50
	1998	F3	F2 × F2	73	75

\*<sup>1</sup> AFP means the transgenic Atlantic salmon transgened AFP gene form winter plounder.

\*<sup>2</sup> GH means the transgenic Atlantic salmon transgened the construct using the ocean pout AFP promoter linked to the chinook salmon GHcDNA.



を検出した。このような遺伝子組換え大西洋サケの多くは成長速度が劇的に向上した。1歳時点において、遺伝子組換え大西洋サケは平均して2~6倍の成長を遂げ、遺伝子組換え大西洋サケの最大のもは平均的な非組換えの対照大西洋サケの13倍の大きさに達した。

## 2) 成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケにおける呼吸代謝および遊泳能力<sup>25)</sup>

本論文では、成長ホルモン遺伝子組換え大西洋サケの酸素消費量は、同程度の大きさを有する非組換え大西洋サケと比較して通常の養殖環境において、また強制遊泳時においてより高いことを示す。成長ホルモン遺伝子組換え大西洋サケはまた、酸素消費を抑制する臨界酸素水準が若干高い。しかし、臨界遊泳速度に関しては差異が見られない。12~13℃で飼育した成長ホルモン遺伝子組換え大西洋サケは、遺伝子組換えF1の雌と非遺伝子組換え雄の精子を用いて作出したF2世代を用いた。遺伝子組換え大西洋サケは試験期間を通し、非組換え大西洋サケと比較して3倍の早さで成長した。通常の養殖環境においては、遺伝子組換え大西洋サケと非組換え大西洋サケの両方とも、酸素消費量について日内周期を示した。しかし、遺伝子組換え大西洋サケの酸素消費量は一日のどの時点においても非組換え大西洋サケの1.7倍に達した。10 mg/Lを超える酸素濃度の場合、いずれの大西洋サケにおいても酸素濃度と酸素消費量に関係は見られなかった。すなわち、臨界酸素消費水準は遺伝子組換え大西洋サケでは6 mg/Lであり、非組換え大西洋サケでは4 mg/Lであった。酸素量が減少した場合、遺伝子組換え大西洋サケと非組換え大西洋サケは同水準の低い酸素濃度において体の均衡を失った。遊泳トンネル内では、遺伝子組換え大西洋サケの酸素消費量は遊泳速度にかかわらず対照大西洋サケの1.6倍であった。臨界遊泳速度は遺伝子組換え大西洋サケ、非組換え大西洋サケのいずれも変わらず、サケ科についての文献値と同様である。

## 3) 成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケにおけるスマルト発達<sup>26)</sup>

スマルト発達に関する本研究では、ゲンゲ (*Macrozoarcus americanus*) の不凍タンパク質遺伝子プロモーターおよびマスノスケの成長ホルモン遺伝子より構成された遺伝子構築物を用いて作出した成長ホルモン遺伝子組換え大西洋サケを使用した。1995年11月、遺伝子組換えF1の精子と通常雌の卵を用いてF2世代の遺伝子組換え大西洋サケを作出した。これらのF2は1996年1月に孵化し2月には摂餌を始めた。当

初から高水温(16℃)で飼育し、気温と照光時間を様々に変えて操作することで、遺伝子組換え大西洋サケは6月にはスマルトサイズ(16 cm)に近づいた。通常の大西洋サケは10 cmに達していなかった。大部分の遺伝子組換え大西洋サケは6月に塩分濃度3.5‰の海水に直接放流後96時間以上生き残った。一方、通常の大西洋サケの生存時間は24時間以下であった。遺伝子組換え大西洋サケは6月後半には鰓のNa<sup>+</sup>/K-ATPアーゼ活性が高く、スマルト状態を示した。7月初めに海水に移した後、様々な温度と照光時間に適応させた遺伝子組換えサケは急速に成長し、1996年10月に実験を中止するまでの間、死亡率も低水準であった。高水温飼育(16℃)は非遺伝子組換え大西洋サケでは上昇したATPアーゼ活性の上昇あるいは維持を抑制したが、遺伝子組換え大西洋サケにおいては鰓のATPアーゼ活性をわずかに低くするとどまった。遺伝子組換え大西洋サケは海水中で4カ月にわたり生存し、順調に生育した。同様に、定常光(LD: 24)を照射した別の実験では、非組換え大西洋サケでは正常なスマルト発達が阻害されたが、組換え大西洋サケではスマルト発達が阻害されたりスマルト後の成長や海水での飼育に悪影響が生じたりすることはなかった。実験の種類にかかわらず、遺伝子組換え大西洋サケは生後6カ月でスマルトが終わり、海水中で十分に生存・成長することが結論付けられた。成長ホルモン遺伝子組換え大西洋サケは至適な成長を示す温度と照光時間で飼育できるが、非組換え大西洋サケはそのような条件では正常なスマルト発達とスマルト後の行動を抑制することが明らかになった。

## 4) 成長促進遺伝子組換え大西洋サケの捕食行動および捕食者に対する行動<sup>27)</sup>

捕食リスクを伴う摂餌行動に影響する主要なパラメーターとして成長速度が用いられてきた。遺伝子操作により、成長ホルモン組換え遺伝子を持ち後世に伝えるよう飼育された遺伝子組換え大西洋サケは、非組換え大西洋サケと比較し成長速度が大幅に高くなった。このような成長促進遺伝子組換え大西洋サケを用いて、相対的な成長速度は補足者に対する暴露リスクを負うことに対する積極性と関連があるという仮説を検証するために試験を実施した。大きさを合わせた遺伝子組換え大西洋サケおよび非組換え大西洋サケに対し、大西洋サケが安全に食料を確保できる場所と捕食者のいる場所で合わせて2回の実験を行った。最初の実験ではプラスチックガラスの仕切りの裏に捕食者を追いやり(死のリスクはない)、2回目の試験では大西洋サケに対し、捕食者と同じ仕切りの中で摂餌

しなければならぬようにした(明らかな死のリスクがある)。これらの実験中、遺伝子組換え大西洋サケは非組換え大西洋サケと比べて摂餌速度がおおよそ5倍速く、また動く速度が対照大西洋サケと比べ約2倍であった。遺伝子組換え大西洋サケは捕食者のいる中で摂餌に費やす時間が有意に長く、またその場所で消費する食物の量も明らかに多かった。実際に捕食される危険がある場合、非組換え大西洋サケはほとんどの場合危険な場所を回避した。遺伝子組換え大西洋サケは危険な場所でもより控えめではあったが摂餌活動を続けた。これらのデータは、遺伝子組換えにより成長を促進した場合、摂餌活動中に大西洋サケが自ら受けるリスクが高まることを示している。成長速度を促進するのに必要な遺伝子操作が進化的変化により達成可能ならば、大西洋サケの成長速度を捕食リスクに応じて最適化できる可能性があることを以上の実験は示唆している。

#### 5) ウィンターフラウンダーの不凍タンパク質遺伝子を導入された遺伝子組換え大西洋サケの肝臓特異的・季節的発現<sup>28)</sup>

ウィンターフラウンダーの不凍タンパクを導入した遺伝子組換え大西洋サケの継承と導入遺伝子の発現を調べた。主に肝臓で発現する不凍タンパク遺伝子(wfAFP-6)由来の2A-7クローンが大西洋サケゲノム中に導入された。遺伝子導入が確認された個体からF3が作出された。サザンブロット解析でF3遺伝子組換え大西洋サケの特異的な部位に1コピーだけが導入されていることが示された。導入部位がクローニングされ、調べられた。ノーザン解析では不凍タンパクmRNAが肝臓だけで発現し、しかも季節的变化があることが示された。F3個体全ての血清中で不凍タンパク前駆体タンパクが同程度のレベルで含まれ、また、血清は不凍活性の存在を示す特徴的な六方晶氷結晶パターンを示した。更に不凍タンパク前駆体レベルは11月に最も高く、5月に最も低いという季節によって変わることが明らかにされた。この研究は遺伝子組換え大西洋サケ1469個体全てのF3で不凍タンパクの組織特異的で安定的な発現を示した。

#### 6) 成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケにおける消化管の形態<sup>29)</sup>

遺伝子組換えF1世代雌の卵と非組換え雄の精子を用いて受精させて作出したF2成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケは12~13℃で飼育された。組織の採取時、遺伝子組換えサケは非組換え大西洋サケと比較して1.6倍早く成長していた。遺伝子組換え大西洋サケ

には非組換え大西洋サケのものよりも長い腸の折り目が数多く見られた。そのため、遺伝子組換え大西洋サケは前小腸(対照サケと比べて表面積1.5倍)および幽門垂(対照サケと比べて表面積1.2倍)の両方で、消化管の表面積はより大きかった。ほとんどの場合、遺伝子組換え大西洋サケの腸および幽門垂は形態学的に非組換え大西洋サケと比較して大きいという特徴が見られた。特に、前小腸の表面積は成長速度の違いと一致していた。

#### 7) 成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケにおける鰓の形態<sup>30)</sup>

成長促進遺伝子組換え大西洋サケの呼吸器系の形態学的特徴として、多くの場合同様のサイズの非組換え大西洋サケと比べて大きいことが挙げられる。F2成長ホルモン遺伝子組換え大西洋サケは、遺伝子組換えF1雌の卵と非組換え雄の精子を用いて作出した。鰓の組織を採取した時点で、遺伝子組換え大西洋サケは非組換え大西洋サケと比べて成長速度が2.1倍早く、酸素消費速度が約1.6倍高かった。本研究では、遺伝子組換え大西洋サケにおける呼吸に利用可能な鰓の表面積は非組換え大西洋サケと比べて約1.24倍であり、酸素消費速度の1.6倍には及ばないことを示した。鰓の呼吸面積が増加するのは、主に各鰓の繊維が比較的均一に増加するためである。

#### 8) 成長促進遺伝子組換え大西洋サケの成長速度、体組成、餌料消化及び餌料効率<sup>31)</sup>

成長促進遺伝子組換え大西洋サケにおいては成長速度の劇的な改善が見られたが、本技術の商業利用を実施する前に、商業的に重要な数々の生産特性を生み出す生理学に関して一層の情報を得る必要がある。そのため、F2世代成長促進遺伝子組換え大西洋サケの成長速度、餌料の消化能力、餌料の転換効率、体組成について、スマルト前の8~55gの成長段階で非組換え大西洋サケとの間で比較した。成長促進遺伝子組換え大西洋サケは、実験期間中、非組換え大西洋サケと比較し成長速度が2.62倍から2.85倍に達した。当該体重期間における遺伝子組換え大西洋サケの一日の食物消費量は、非組換え大西洋サケと比較して2.14倍から2.62倍に達した。遺伝子導入によってもタンパク質およびエネルギーの吸収範囲には影響は生じず、いずれも比較可能な体重間隔で測定した消化率係数は遺伝子組換え大西洋サケではそれぞれ88%および81%、非組換え大西洋サケではそれぞれ90%、84%であった。しかし、総餌料転換効率については遺伝子組換え大西洋サケは非組換え大西洋サケと比較し10%の改善が見ら

れた。遺伝子組換え大西洋サケの体内のタンパク質、乾燥重量、灰分、脂質、エネルギーは非組換え大西洋サケと比べて有意に少なく、一方水分は有意に多かった。本研究で使用した遺伝子導入実験対象の大西洋サケは、大西洋サケの通常の範囲を超えて成長を加速させるのに必要な生理的可塑性を有しており、食欲が高まり、体が細くなることを除けばほとんど影響は見られない。

#### 9) スモルト前の成長促進遺伝子導入大西洋サケの代謝速度<sup>32)</sup>

遺伝子組換え大西洋サケの代謝速度がより早くなるか調べるために、スモルト前の体重8~55gの段階で間隔において成長促進遺伝子組換え大西洋サケの定常酸素消費速度を非組換え大西洋サケと比較した。摂餌による熱量増加も含めた遺伝子組換え大西洋サケの定常酸素消費速度 (mg O<sub>2</sub>/時) は、非組換え大西洋サケと比べて1.54~1.70倍に達した。しかし、摂餌開始からスモルトサイズに達するまでの期間全体でみると、遺伝子組換え大西洋サケはスモルトサイズに達するまでに、非組換え大西洋サケと比べて酸素の実際の総消費量は42%少なかった。24時間の飢餓状態においては、遺伝子組換え大西洋サケの同条件における酸素消費速度は通常の大西洋サケと比べて1.58~2.30倍高かった。スモルトを生産する側にとっては、このような成長促進された魚類の活発な代謝を支えるために短時間でより多くの水あるいは酸素が必要になるという新たなデメリットはあるものの、スモルトの生産に必要な時間の短縮という利益を考えれば妥当なものと思われる。

#### 10) 食物欠乏が成長促進遺伝子組換え大西洋サケの酸素消費および身体形成に対し影響<sup>33)</sup>

F2世代成長促進遺伝子組換え大西洋サケにおいて食物欠乏が酸素消費速度およびエネルギー備蓄の利用・活用速度に対し及ぼす影響について、スモルト前の体重8gから55gまでの期間中、非組換え大西洋サケとの比較を行った。食物欠乏の8週間のうちほとんどの期間において、遺伝子組換え大西洋サケは対照大西洋サケと比較して酸素消費速度が早かっただけでなく、飢餓が進行するにつれて酸素消費量も急速に減少した。その結果、当初の体重および食物欠乏の期間の長さによっては、遺伝子組換えサケの酸素消費速度は非組換え大西洋サケの酸素消費量と同等あるいはそれ以下の水準にまで減少した。遺伝子組換え大西洋サケは非組換え大西洋サケと比べて、より急速に体のタンパク質、乾燥重量、脂質、エネルギーを使い果たした。

さらに、両グループにおいて、脂質はタンパク質よりも早く分解された。非組換え大西洋サケでも観察されるのと同様に、遺伝子組換え大西洋サケは飢餓時に代謝速度を低下させる能力を示すが、高い代謝速度を維持する傾向があり、さらに最初の内因性エネルギー備蓄量の低さも合わさって、非組換え大西洋サケと比較し、成長促進遺伝子組換え大西洋サケが集約的な養殖環境外で最大限に生育する、あるいはそもそも生存しうる可能性は低い可能性があると考えられる。

#### 11) 2倍体および3倍体の遺伝子組換え大西洋サケの血液学<sup>34)</sup>

本研究は、大西洋サケの代謝速度と血液学の相互作用について明らかにするために、2倍体および3倍体遺伝子組換え大西洋サケおよび非組換え大西洋サケの赤血球の高さと長さ、ヘマトクリット、血中総ヘモグロビン濃度、平均細胞ヘモグロビン量を調べたものである。2倍体、3倍体いずれにおいても、3倍体遺伝子組換え大西洋サケ赤血球は2倍体赤血球と比較して有意に長く、それと比例して薄い。このような形態上の差異により、3倍体大西洋サケの赤血球は幅が長さの53%程度と楕円形の外見であるのに対し、2倍体大西洋サケの赤血球は幅が長さの62%程度とより丸型である。同様に、2倍体および3倍体遺伝子組換え大西洋サケの赤血球は、非組換え大西洋サケの赤血球と比べて有意に短く薄い (P<0.0001)。有意な差異ではないが、チャンネル式コールターカウンターを使用した実験により、遺伝子組換え大西洋サケの赤血球は同倍数の非組換え大西洋サケの赤血球と比べて総数は多く、サイズは小さいことが示された。遺伝子組換え大西洋サケは活発な代謝速度に対応できるよう、体積に対し表面積が大きい赤血球を生成するものと思われる。同一倍数体の遺伝子組換え大西洋サケと非組換え大西洋サケの間に、その他の大きな血液学上の差異は見出されなかった。

#### 12) スモルト後の成長ホルモン組換え大西洋サケにおける呼吸循環器系の変化および限界<sup>35)</sup>

近年、成長ホルモン遺伝子導入がどのように魚の生理に影響を与えるかについて関心が高まっている。しかし、遺伝子組換え魚類と非組換え魚類の飼育環境・飼育歴は非常に異なるため、研究結果の解釈は大変困難であることが多い。本研究では成長ホルモン遺伝子組換え大西洋サケの呼吸循環器系の生理について包括的に調べるため、非組換え大西洋サケと同じタンクで飼育した (10℃で最大9ヶ月間) 大きさの同じ成長ホルモン遺伝子組換え大西洋サケの安定発現システムを使用

したものであり、同時形態形成理論の新しい試験として位置づけられる。成長ホルモン遺伝子組換え大西洋サケは成長速度が3.6倍早く、また質量特異的な定常酸素消費量および標準酸素消費量 ( $MO_2$ ) はそれぞれ21%、25%高かった。しかし、最大  $MO_2$  には同時増加が見られず、その結果遺伝子組換え大西洋サケの代謝範囲は18%、臨界遊泳速度は9%減少した。遺伝子組換え大西洋サケの心臓が29%大きく、質量特異的な最大 *in situ* 心臓拍出量が18%高く、ストレス後の血中ヘモグロビン濃度が14%高く、赤色筋および心臓の好気性酵素(クエン酸シンターゼまたはシトクロームオキシダーゼ)の作用が5~10%活発であり、静止状態でのカテコラミン水準は2倍、ストレス後のカテコラミン水準は1.7倍高いことを考えると、このような代謝能力・効率の低下は驚くべきことであった。しかし、呼吸循環器系に関する指標のうち鰓の表面積のみは拡大しておらず、我々の有するデータでは鰓からの酸素移動は限定的であることが示唆されている。全体的には、本研究では以下の点が確認された。(1)この大西洋サケの系統において成長ホルモン遺伝子導入により有意な代謝面コストが生じることが示された。(2)成長ホルモン遺伝子導入により心機能が增強される直接の証拠が初めて示された。(3)同時形態形成により示唆されるような、スマルト後(成魚)に成長ホルモン遺伝子組換え大西洋サケにおいて呼吸循環器系の生理機能の全般的な発現増加は見られない。(4)動脈を通じた酸素移動に関する差異(心臓拍出量や血液酸素運搬能など)は、異なる種間の好気呼吸に関する差異を決定づける重要な要因であるが、同じ種の中で代謝・遊泳能力の大幅な改善を実現するには拡散律速過程を増進させる必要があるという考え方が支持された。

### 13) 大西洋サケにおけるゲンゲ (*Macrozoarces americanus*) 不凍タンパク質 OP5a 遺伝子プロモーターにより生じる不凍タンパク質・成長ホルモン導入遺伝子の組織特異的発現<sup>36)</sup>

養殖向けに遺伝的に改良された大西洋サケの品種を生み出すことを目的としたこれまでの研究により、ゲンゲの OP5a 不凍タンパク質 (AFP) 遺伝子に部分的に由来する遺伝子構築物を使用し、2種類の遺伝子組換え大西洋サケの系統が作出された。その系統のうち一つはプロモーターの5'領域が除去された OP5a AFP 遺伝子を使用して作出され (t-OP5a-AFP と称する)、もう1つの系統には t-OP5a-AFP 構築体のプロモーターとほとんど同一の切断された OP5a プロモーターにより活性化するマスノスケの成長ホルモン cDNA

で構成される成長ホルモン (GH) 導入遺伝子 (EO-1 $\alpha$ ) が含まれる。これらの導入遺伝子のプロモーター領域は類似しているため、組織特異的な発現パターンについて評価することが可能である。ノーザンブロット法および RT-PCR 法を用いて mRNA の発現について評価を行った。その結果、ほぼ全ての体組織において AFP および成長ホルモン導入遺伝子が発現したことが示され、OP5a AFP 遺伝子のプロモーター領域には組織特異的要素が欠けていることが示唆されている。ノーザン解析により t-OP5a-AFP 遺伝子の発現は EO-1 $\alpha$  成長ホルモン導入遺伝子の発現に比べ、かなり強いことが明らかになった。導入した成長ホルモン遺伝子は脾臓組織にのみ、ハイブリダイズしているバンドが認められた。一方、AFP 遺伝子導入体の場合、血球を除く全ての組織に明確なバンドが見られ、心臓、肝臓、脳の組織に最も高水準の mRNA 発現が見られた。このような高水準の発現が見られたのは、t-OP5a-AFP 導入遺伝子にイントロンが存在するためと思われる。成長ホルモン遺伝子組換え大西洋サケは非組換え大西洋サケと比較して成長が大幅に速いため、この系統における成長ホルモン導入遺伝子発現の程度は低いものの、望ましい急成長の表現型を示すには十分であった。一方、AFP 遺伝子組換え大西洋サケの凍結耐性を少しでも改善するには、AFP 発現の程度は不十分であった。

### 14) 大西洋サケの成長ホルモン導入遺伝子のプロモーター解析<sup>37)</sup>

成長ホルモン遺伝子組換え大西洋サケの系統を作出するためにゲンゲ (*Macrozoarces americanus*) の op5a 不凍タンパク質遺伝子プロモーターが使用され、成長速度は大幅に速まった。この遺伝子組換え大西洋サケのゲノムに組込まれた成長ホルモン導入遺伝子 (EO-1 $\alpha$ ) について調べた結果、2115 bp プロモーターのうち最初の1579 bp が削除され、成長ホルモンのコード化領域の下流側に転写されたことが示され、切断されたプロモーターが成長ホルモン導入遺伝子を発現させる能力および転写された5'プロモーター領域の潜在的影響について問題を投げかけている。本研究では、11のプロモーター構築体をルシフェラーゼレポーター遺伝子に結合し、それぞれ21℃および37℃で培養したサケおよびヒトの細胞株に移入した後、その転写能力について調査した。構築物の発現は266 bp 未満の構築物を除く全ての細胞株で同様であり、大西洋サケの細胞における発現はヒトの細胞における発現を大幅に上回っていた。研究結果から、プロモーター内の複数部位に遺伝子発現の調節を可能にする正および負

の調節領域があることが示された。プロモーターから最初の1579 bp を除去すると、完全な長さのプロモーターが示すルシフェラーゼ発現が70%失われ、一方ルシフェラーゼレポーター遺伝子の下流に削除された5'プロモーター配列を連結させてもその損失の約10%が回復するにすぎなかった。この結果は、EO-1 $\alpha$ 導入遺伝子の *in vivo* 発現は、転写された5'プロモーター領域と連結する弱い切断されたプロモーター内の構成要素により生じることを示唆している。

## 5. 今後の対応

以上、現在 FDA に食品として出荷できるように申請している遺伝子組換え大西洋サケを用いた実験結果の論文の要旨を紹介した。詳しくは直接論文を参照してほしい。本報告を書いている2010年5月現在、FDA が遺伝子組換え大西洋サケを許可したという発表はない。しかし、申請者である AquaBounty Technologies 社のホームページから、同社ではすでに FDA が要求する資料は全て提出し、許可がおりるのを待っている状況である（2009年11月25日、同社プレスリリースより）。このような状況に対し、日本では農林水産省技術会議が「遺伝子組換え生物の産業利用における安全性確保総合研究」を行い、この中で遺伝子組換え大西洋サケに関する情報収集や大西洋サケと日本の在来種との競合性試験などを調査して、遺伝子組換え大西洋サケに関する情報の収集や日本に入ってくる場合に考えられる影響などに対するリスク調査・研究を行っている。また、厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所でも遺伝子組換え魚類の情報について収集を行い、これらの組換え魚類の検知技術について研究を行っている。

遺伝子組換え魚類に関して、育種手法として利用することによって様々な応用が望まれる一方、これらの食品に対する消費者の反応はまだまだ理解されているとは言えない。そのような状況の中でこれらの遺伝子

組換え魚類を安易に日本に輸入することは考えられないが、他の輸入さけ・ます類にも影響が及ぶことも考えられる。遺伝子組換え大西洋サケ以外にも多くの組換え魚類が作出されている。今後とも、これらの開発状況を正しく把握することが必要と思われる。

## 6. 関連情報

最後に読者が遺伝子組換え大西洋サケに興味を持ち、最初の情報のよりどころとして利用できそうなインターネットのサイト情報について下記の3つをあげ、遺伝子組換え大西洋サケに関する話題の提供としたい。

- 6.1 遺伝子組換え大西洋サケを開発、販売使用としている会社 (AquaBounty Technologies 社ホームページ：<http://www.aquabounty.com/>)
- 6.2 米国食品医薬品局 (FDA) ホームページの中で遺伝子組換え動物に関するサイト：<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/-GeneticEngineering/GeneticallyEngineeredAnimals/default.htm> (本ホームページからガイダンスについても参照可能)
- 6.3 遺伝子組換え大西洋サケに関する特許：US Patent No. 5548805 (Transgenic salmonid fish expressing exogenous salmonid growth hormone. by Hew et al., Aug. 13'96)

## 謝 辞

本原稿は農林水産省技術会議研究予算「遺伝子組換え生物の産業利用における安全性確保総合研究」及び厚生労働科学研究費補助金、食品の安心・安全確保推進研究事業「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」によって実施された。

## 文 献

- 1) MacCrimmon, H. R. and B. L. Gots (1979) World distribution of Atlantic salmon, *Salmo salar*. J. Fish. Board Can., 36: 422-457.
- 2) Sedgwick, D.S. (1982) The salmon handbook: the life and cultivation of fishes of the salmon family. Andre Deutsch Ltd., London, UK, pp. 247.
- 3) Scott, W.B., and E.J. Crossman (1973) Freshwater Fishes of Canada. Bull. Fish. Res. Board Can., 184: 192-197.
- 4) Hansen L.P. and T. P. Quinn (1998) The marine phase of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) life cycle, with comparisons to Pacific salmon. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 55 (Suppl.1): 104-118.
- 5) Berg, O. K. (1985) The formation of non-anadromous populations of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Europe. J. Fish Biol., 27: 805-811.
- 6) 丸山為蔵・藤井一則・木島利通・前田広也 (1987) 外国産新魚種の導入経過. 水産庁研究部資源課・水産庁養殖研究所, pp. 137.
- 7) 大西洋サケ飼育試験 (1982) 昭和56年度日ソ漁業協力種苗等交換委託事業実績報告書 青森県, 5-9, 17-18.
- 8) 種苗飼育事業 (大西洋サケ) (1983) 昭和57年度日ソ漁業協力種苗等交換委託事業実績報告書 青森県, 1-8, 17-18.
- 9) 種苗飼育事業 (大西洋サケ) (1984) 昭和58年度日ソ漁業協力種苗等交換委託事業実績報告書 青森県, 1-8, 9-17, 19.
- 10) 種苗生産試験 (大西洋サケ) (1985) 昭和59年度日ソ漁業協力種苗等交換委託事業実績報告書 青森県, 1-7, 11-14, 18-20.
- 11) 種苗飼育試験 (大西洋サケ) (1986) 昭和60年度日ソ漁業協力種苗等交換委託事業実績報告書 青森県, 1-16.
- 12) 種苗飼育経過 (大西洋サケ) (1987) 昭和61年度日ソ漁業協力種苗等交換委託事業実績報告書 青森県, 1-29.
- 13) 種苗飼育経過 (大西洋サケ) (1988) 昭和62年度日ソ漁業協力種苗等交換委託事業実績報告書 青森県, 1-13.
- 14) 種苗飼育経過 (大西洋サケ) (1989) 昭和63年度日ソ漁業協力種苗等交換委託事業実績報告書 青森県, 1-13.
- 15) 種苗飼育経過 (大西洋サケ) (1990) 平成元年度日ソ漁業協力種苗等交換委託事業実績報告書 青森県, 1-8, 11-26.
- 16) Hew, C. L., G. L. Fletcher and P. L. Davies (1995) Transgenic salmon: tailoring the genome for food production. J. Fish Biol., 47 (Suppl. A): 1-19.
- 17) DeVries, A. L., S. K. Komatsu and R. E. Feeney (1970) Chemical and physical properties of freezing point depressing glycoproteins from Antarctic fishes. J. Biol. Chem., 245: 2901-2913.
- 18) Davies, P. L. and C. L. Hew (1990) Biochemistry of fish antifreeze proteins. FASEB Journal, 4: 2460-2468.
- 19) Fletcher, G. L., M. A. Shears, M. J. King, P. L. Davies and C. L. Hew (1988) Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 45: 352-357.
- 20) Shears, M. A., G. L. Fletcher, C. L. Hew, S. Gauthier and P. L. Davies (1991) Transfer expression and stable inheritance of antifreeze protein genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 1: 58-63.
- 21) Hew, C. L., N. C. Wang, S. Yan, H. Cai, A. Schlater and G. L. Fletcher (1986) Biosynthesis of antifreeze polypeptides in winter flounder: characterization and seasonal occurrence of precursor polypeptides. Eur. J. Biochem., 160: 267-272.
- 22) Fletcher, G. L. and P. L. Davies (1991) Transgene fish for aquaculture. In Genetic Engineering Principles and Methods, Vol. 13 (Setlow, J. K., ed.), pp. 331-370. New York, Plenum Press.
- 23) Fletcher, G. L., S. V. Goddard and C. L. Hew (2000) Current status of transgenic Atlantic salmon for aquaculture. pp. 179-184, In "Proceedings of the 6<sup>th</sup> International symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms" eds. by C. Fairbairn, G. Scoles and A. McHughen, Saskatoon (Canada), University Extension Press.
- 24) Du, S. J., Z. Gong, G. L. Fletcher, G. L., Shears, M. A. King, D. R. Idler and C. L. Hew (1992) Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. Bio/technology, 10: 176-181.
- 25) Stevens, E. D., A. Sutelin, and T. Cook (1998) Respiratory metabolism and swimming performance in growth hormone transgenic Atlantic salmon. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 55: 2028-2035.

- 26) Sauders, R. L., G. L. Fletcher and C. L. Hew (1998) Smolt development in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Aquaculture*, 168: 177-193.
- 27) Abrahams, M. V. and A. Suttelin (1999) The foraging and antipredator behaviour of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon. *Anim. Behav.*, 58: 933-942.
- 28) Hew, C. L., R. Poon, F. Xiong, S. Gauthier, M. Shears, M. King, P. Davies and G. L. Fletcher (1999) Liver-specific and seasonal expression of transgenic Atlantic salmon harboring the winter flounder antifreeze protein gene. *Transgenic Res.*, 8: 405-414.
- 29) Stevens, E. D., G. N. Wagner and A. Sutterlin (1999) Gut morphology in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *J. Fish Biol.*, 55: 517-526.
- 30) Stevens, E. D. and A. Suttelin (1999) Gill morphometry in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Environ. Biol. Fishes*, 54: 405-411.
- 31) Cook, J. T., M. A. McNiven, G. F. Richardson and A. M. Sutterlin (2000) Growth rate, body composition and feed digestibility / conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 188: 15-32.
- 32) Cook, J. T., M. A. McNiven and A. M. Sutterlin (2000) Metabolic rate of pre-smolt growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 188: 33-45.
- 33) Cook, J. T., A. M. Suttelin and M. A. McNiven (2000) Metabolic rate of pre-smolt growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 188: 47-63.
- 34) Cogswell, A. T., T. J. Benfey and A. M. Sutterlin (2001) The hematology of diploid and triploid transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, 24: 271-277.
- 35) Deitch, E. J., G. L. Fletcher, L. H. Petersen, I. A. S. F. Costa, M. A. Shears, W. R. Driedzic and A. K. Gamperl (2006) Cardiorespiratory modifications, and limitations, in post-smolt growth hormone transgenic Atlantic salmon *Salmo salar*. *J. Exp. Biol.*, 209: 1310-1325.
- 36) Hobbs, R. S. and G. L. Fletcher (2008) Tissue specific expression of antifreeze protein and growth hormone transgenes driven by the ocean pout (*Macrozoareces americanus*) antifreeze protein OP5a gene promoter in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Transgenic Res.*, 17: 33-45.
- 37) Butler, T. M. and G. L. Fletcher (2009) Promoter analysis of a growth hormone transgene in Atlantic salmon. *Theriogenology*, 72: 62-71.

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
「第 3 世代バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保と  
リスクコミュニケーションに関する研究」  
分担研究報告書（平成 22 年度）

遺伝子組換え動物の安全性評価に関する研究

分担研究者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨

平成 21 年度は、モデル遺伝子組換えベクターとして、*loxP* 配列で緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*GFP*) とピューロマイシン耐性遺伝子 (*Puro<sup>r</sup>*) を挟み込んだベクター (plex) を構築し、このモデル遺伝子組換えベクターを導入したモデル ES 細胞の樹立を行った。平成 22 年度は、これらのモデルベクターとモデル ES 細胞を用いて、いくつかの *loxP* 配列検出系の開発を試み、インバース PCR による検出が可能であることがわかった。また Cre リコンビナーゼの細胞への導入が困難であることが判明したことから、Cre リコンビナーゼ発現ベクターの構築を行い、モデル ES 細胞中での Cre リコンビナーゼの発現を行った。その結果、ベクター導入モデル ES 細胞において、Cre リコンビナーゼのが発現することを確認した。

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）  
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ビ

ン（血液凝固因子）が認可を受けている。また近年の各種動物の多能性幹細胞研究の進展から単純なトランスジェニック動物の作出だけでなく、より高度な遺伝子組換え（ノックインやノックアウト）動物の作出も可能になりつつある。例えばニワトリでは、鶏卵成分を一部改変したようなニワトリが誕生しつつある。単純なトランスジェニック動物であれば、導入された外来遺伝子を標的に遺伝子組換え動物の産物か否かを簡便に検出可能である。しかし、多能性幹細胞を用いた高度な遺伝子組換え動物では、組み込まれた外来遺伝子を排除できるシステムの導入が可能であり、食品などへの応用を考えた場合、このシステムが利用されることが予想される。このシステムの一つが Cre-*loxP* のシステムであり、排除したいマーカー遺伝子などを *loxP* の配列で挟み込んでおき、後に不要となったマーカー遺伝子は、Cre リコンビナーゼの作用により切り出しできるシステムで



ある(図1)。この場合、遺伝子組換え動物か否かを検知するには、その標的外来遺伝子は、34 bp程度の残存する *loxP* 配列かもしくは、ゲノムに組み込まれている Cre リコンビナーゼの配列となる。ただし、Cre リコンビナーゼはゲノムに組み込まなくても細胞に作用させることが可能であり、確実に遺伝子組換え動物か否かを検知するには、残存する *loxP* 配列を検知する必要がある。

そこで本研究では、高度な遺伝子組換え動物の検知技術を構築することを目的に、モデルベクターを用いた *loxP* 配列検出系の構築とモデル ES 細胞での Cre リコンビナーゼの発現を行った。

## B. 研究方法と結果

*loxP* 配列検出系の構築するために、まずモデルベクター (plex) にチューブ内で直接 Cre リコンビナーゼを作用させたものを鋳型に以下の3つの検出方法を試行した。

### 1) PCR による検出

34塩基しかない *loxP* 配列の末端に図2Aのようにプライマーセットを組み、PCRによる増幅を試みたが、図2Bに示したように、34塩基の増幅を示すバンドは認められなかった。

### 2) ランダムプライマーを用いた PCR による検出

34塩基の *loxP* 配列の直接的な検出が困難であったため、次にランダムプライマーと *loxP* 特異的プライマーを用いた PCR による検出を試みた(図3A)。鋳型には、Cre リコンビナーゼを作用させたモデルベクター (plex: +) 以外に *loxP* 配列を含まないコントロールベクター (pEIP: -) を使用した。*loxP* 配列の検出判定では、この2種に鋳型による増幅パターンの違いから *loxP* 配列の

有無が判定できるのではないかと考えた。しかし、PCRの結果、ベクター間での増幅のパターンの大きな違いが認められず、ランダムプライマーを用いたPCRによる検出は困難であることがわかった。

### 3) インバース PCR による検出

インバース PCR とは、例えばゲノム DNA 上の特定の配列の周辺の塩基配列をクローニングするための方法であり、ゲノム DNA を適当な制限酵素で処理した後、セルフライゲーションを行い、特定配列の外向きに設定したプライマーで PCR を行う方法である(図4)。この手法では、セルフライゲーションさせた環状の DNA 中に、プライマーを設定した特定配列が無ければ、PCR による増幅は起こらない。そこで、Cre リコンビナーゼを作用させたモデルベクター (plex) に図5Aのように *loxP* 配列の外向きにプライマーセットを設定しインバース PCR を行った。陰性対象には *loxP* 配列を含まないベクター (pEIP) を使用し、Rプライマーには配列の異なる2種(R1とR2)を設計した。その結果、F-R1プライマーを用いたPCRの場合にベクターから予想される分子量付近に明瞭な増幅を示すバンドが認められた(図5B:矢頭)。そこで次に、この増幅断片をクローニングし、塩基配列の確認を行ったところ、目的にベクター配列であることが確認され(結果は示していない)、ベクターを鋳型にした場合にインバースPCRにより *loxP* 配列の有無を検出できることが判明した。

### 4) ES 細胞における Cre リコンビナーゼの発現

ベクターを用いたインバース PCR により、*loxP* 配列の検出が可能であったことから、次はモデル ES 細胞やその細胞の移植実験から得られるキメラ体からの検出が必要となる。モデル ES 細胞で

は、*loxP*配列で挟まれた緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*GFP*) とピューロマイシン耐性遺伝子 (*Puro<sup>r</sup>*) が導入されており、ゲノム DNA 中に *loxP* 配列が 2 コピー導入されている。そこで、細胞に Cre リコンビナーゼを作用させて、*GFP* と *Puro<sup>r</sup>* 遺伝子を除去し、*loxP* 配列が 1 コピーのみ導入された ES 細胞を準備する必要がある。平成 21 年度には、ドラッグデリバリーシステムを用いて、Cre リコンビナーゼを直接細胞内に導入することを試みたが、この方法では非常に効率が悪く、最終的に *loxP* 配列が 1 コピーのみ導入された ES 細胞を得ることができなかった。そこで、平成 22 年度は、Cre リコンビナーゼ遺伝子を導入した真核細胞発現ベクターを準備し、モデル ES 細胞で強制的に Cre リコンビナーゼの発現を誘導した。

pcDNA3.1 ベクターに Cre リコンビナーゼ遺伝子をクローニングし、構築した発現ベクターが細胞内で機能するかどうかを COS7 細胞で試験した。ベクターをリポフェクション法により COS7 細胞に導入 48 時間後に抗 Cre リコンビナーゼ抗体により細胞の免疫染色を行ったところ、COS7 の核で Cre リコンビナーゼが発現していることが確認された (図 6)。そこで次にモデル ES 細胞に対して、エレクトロポレーション法を用いて Cre リコンビナーゼ発現ベクターを導入した。導入 42 時間後に抗 Cre リコンビナーゼ抗体により細胞の免疫染色を行ったところ、ES 細胞のコロニーのいくつかの細胞で Cre リコンビナーゼが発現していることがわかった (図 7)。

(倫理面への配慮)

本研究で実施している組換え DNA 実験は、我が

国が定める「生物の多様性確保に関する法律」を順守し、協力研究者が研究を実施する広島大学において規定されている「広島大学組換え DNA 実験安全管理規則」に従い適正に研究計画を立案し、機関承認を得ている。また実験動物の使用に関しては、同じく同機関が定める「広島大学動物実験実施規則」に従い研究計画書 (承認番号 C09-1) を提出するとともに、本実施規則に従い適切に実験動物を使用している。

### C. 考察

動植物における遺伝子組換え技術は、年々高度化が進み、単純に遺伝子を強制発現させるだけではなく、いわゆる遺伝子改変マウスと同様にノックインやノックアウトが可能になりつつある。この技術では、生物のゲノムの一塩基から変異導入が可能であり、そのため遺伝子改変を検知する技術も高度化させる必要がある。現在のところ動物において、この技術が適応可能なのは、多能性幹細胞が樹立されている動物種に限られているが、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立方法が構築されたことから、今後益々適応可能な動物種が増加することが予想される。いずれにしろ、多能性幹細胞を標的に遺伝子改変を行うには、培養細胞の選抜が必要であり、そのためには薬剤耐性遺伝子を多能性幹細胞に導入しなければならないため、この薬剤耐性遺伝子を標的に検出系が構築できる。しかし遺伝子改変動物やその生産物を食品へ利用するには薬剤耐性遺伝子などの外来遺伝子は不要であり、またその除去が必要であり、Cre-*loxP* のシステムが適応されるものと考えられる。この場合、薬剤耐性遺伝子はゲノム中から

排除されるため、ゲノムに挿入された Cre リコンビナーゼ遺伝子か、排除後に残る *loxP* 配列が標的となる。さらに選抜後に一過的発現により Cre リコンビナーゼを作用させる方法では、ゲノム中に Cre リコンビナーゼ遺伝子は挿入されないため、*loxP* 配列のみが標的となることも予想される。本研究では、この *loxP* 配列のみを標的とした遺伝子組換え動物もしくはその産物の検知系を構築することを目的に、平成 22 年度には *loxP* 配列の検出系の構築の試みとモデル ES 細胞での Cre リコンビナーゼ遺伝子の発現を行った。

*loxP* 配列の検出系の構築では、モデルベクターを鋳型とした 3 つの PCR 法を試行し、*loxP* 配列の検出にはインバース PCR が有効であることがわかった。しかし、本実験では鋳型としてモデルベクターを使用していることから、反応系には *loxP* 配列をもつ DNA 集団のみが存在しており、細胞や組織から抽出したゲノム DNA を鋳型にした場合に同様の検出が可能であるかは現在のところ不明である。

上記の結果にもあるように、インバース PCR が実際の検出系に有効であるかを検証するためには、ES 細胞のゲノム中に 1 コピーの *loxP* 配列が挿入された細胞クローンを準備する必要がある。そこで、本研究では真核細胞で Cre リコンビナーゼを発現できるベクターの構築を行い、実際に ES 細胞で Cre リコンビナーゼの発現に成功した。今後は、Cre リコンビナーゼを発現した細胞のみをクローニングすること、またこの細胞で *loxP* 配列に挟まれたマーカー遺伝子が確実に除去され細胞のゲノム中に 1 コピーの *loxP* 配列が存在することを確認する必要があり、この点は平成 23 年の研究課題と

した。

#### D. 結論

平成 22 年度は、高度な遺伝子組換え技術により作製された遺伝子組換え動物から、外来遺伝子として残存する *loxP* 配列を検出することを目的として、*loxP* 配列の検出系にインバース PCR が有効なことを明らかにし、また Cre リコンビナーゼ遺伝子導入 ES 細胞の樹立に成功し、年度内に計画したほぼすべての内容を実施期間中に終了させた。今後は考察で述べたいいくつかの問題点を解決するとともに、実際に細胞や遺伝子組換え鶏の組織のゲノムからの検出系を構築する。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 堀内浩幸, 中野幹治, 鶏の遺伝子組換え技術のこれまでとこれから (隔月連載)
- ①育種 (品種改良) と遺伝子組換え 1, 鶏の研究 (6月号) (2010).
- ②育種 (品種改良) と遺伝子組換え 2, 鶏の研究 (8月号) (2010).
- ③遺伝子組換えという技術の基礎 1, 鶏の研究 (10月号) (2010).
- ④遺伝子組換えという技術の基礎 2, 鶏の研究 (12月号) (2010).
- ⑤遺伝子組換え鶏の作出方法 1, 鶏の研究 (2月号) (2011).
- ⑥遺伝子組換え鶏の作出方法 2, 鶏の研究 (4月

号) (2011).

3) Fukushima, Y., Sato, M., Matsuda, H., Furusawa, S. and Horiuchi, H. Construction of an insertion vector for gene targeting of chicken lens-specific gene. *J. Poultry Sci.*, 47 (2): 144-148 (2010).

4) Nakano, M., Arisawa, K., Yokoyama, S., Nishimoto, M., Yamashita, Y., Sakashita, M., Ezaki, R., Matsuda, H., Furusawa, S. and Horiuchi, H. Characteristics of novel chicken embryonic stem cells established using chicken leukemia inhibitory factor. *J. Poultry Sci.*, 48 (1): 64-72 (2011).

## 2. 学会発表

1) Nakano, M., Fukushima, Y., Arisawa, K., Nishimoto, M., Yamashita, Ezaki, R., Furusawa, S., Matsuda, H. and Horiuchi, H. Establishment of novel chicken embryonic stem cells capable of differentiating into germ cells. Developmental Biology 69<sup>th</sup> Annual Meeting, New Mexico (USA), August 5-9 (2010).

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許所得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし