

ノロジー応用魚や動物のゲノムに残るケースと残らないケースが想定される。一方で、LoxP 配列はバイオテクノロジー応用魚や動物のゲノムに必ず残る。そこで、LoxP 配列のみを手掛かりとしてバイオテクノロジー応用魚や動物に由来する材料を検知するための方法を作成することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 文献調査

論文、インターネット、新聞を使って非食用バイオテクノロジー応用魚、ニワトリ、ブタ、その他の生物の開発状況についての情報収集を行った。それらの情報の中から検知のために有用と考えられる項目の一覧表を作った。今回の調査では平成 21 年度以前に行っていた調査で収集していた情報に新しい情報を追加した。

(2) LoxP 配列の検知

LoxP 配列をゲノムに導入した GM ニワトリの ES 細胞を広島大学・堀内浩幸先生からご供与いただいた。LoxP 配列のみを手掛かりとしてバイオテクノロジー応用魚や動物に由来する材料を検知するためのモデル実験として、この細胞を材料に研究を行う。この細胞から抽出したゲノミック DNA を使用してアダプターラーゲーション法によって LoxP 配列の検出を目指す。今年度は LoxP 配列をゲノムに導入した GM ニワトリの ES 細胞からゲノミック DNA を抽出した。Molecular Cloning 2nd edition 9.16-19 ページに記載された方法を用いた。この方法の概略は RNase

処理、プロテアーゼ K 処理、フェノール抽出、エタノール沈殿を組み合わせたものである。

C. 研究結果と考察

(1-1) 非食用バイオテクノロジー応用魚について

ゼブラフィッシュを用いて遺伝子の機能を調べた研究が近年に多数報告されていた。ゼブラフィッシュが研究のためのモデル魚として頻りに利用されるようである。導入される遺伝子、プロモーター、ターミネーターでは特定の配列が使用される傾向はなく、多様である。ゼブラフィッシュは通常は食用にしない。また、研究用に開発した GM 魚は実験室で飼育されるにとどまり、野外で飼育、放流することはないと予想される。したがって、今回の調査で調べた GM ゼブラフィッシュについては食品への混入危害の懸念は少ないと思われる。

食用に供しうる魚についての非食用バイオテクノロジー応用魚としてはマス 2 報、ナマズ 1 報の論文報告があった。これらの魚は研究用に作成されており、大量に生産されて食品に混入する可能性は低いと思われる。

今年度の調査では 20 報の論文に記載されている情報を平成 21 年度までの調査で得られていた情報に追加した。これらの情報を表 1 に示した。今回の調査で取り上げられなかった論文があり、今後も調査を続

けたい。

(1-2) 非食用バイオテクノロジー応用
ニワトリについて

本年度の調査では論文 5 報の情報を集めた。これらを表 2 にまとめた。該当する論文数は少なかった。遺伝子導入のためのベクターとしてはレンチウイルスが 4 報で使われていた。導入される遺伝子の中に woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element (WPRE) が 2 報に含まれていた。これらの情報は非食用バイオテクノロジー応用ニワトリの検知法の作成を考えるとときに有用である。

GM ニワトリを作成するための遺伝子導入法としてはレトロウイルスが広く使われてきたが、ES 細胞や始原生殖細胞 (PGC) などの多能性幹細胞を使う方法が開発中である。これらの方法が確立されると GM ニワトリの作成のための技術は大きく前進することが予想される。

(1-3) 非食用バイオテクノロジー応用
ブタについて

今回の調査で論文 29 報に記載されている情報を収集した。これらを表 3 に示した。導入される遺伝子は多様であるが、GFP と eGFP で 8 報を占めた。プロモーターでは CMV プロモーターまたは CMV immediate early プロモーターが 8 報で使われた。マーカーではネオマ

イシン耐性が 10 報で利用されていた。これらの情報は非食用バイオテクノロジー応用ブタの検知法の作成を考えるとときに有用である。非食用バイオテクノロジー応用ブタの利用目的の一つは臓器移植である。現在では移植片に対する拒絶反応を制御する方法が完全には確立できていないようである。したがって、臓器移植を目的として非食用バイオテクノロジー応用ブタが大量に飼育される段階には達していないようである。しかし、遺伝子導入法の改良のための論文が数報発表されており、その技術は前進していると思われる。

(1-4) その他の非食用バイオテクノロジー応用生物について

2011 年 1 月 28 日、読売新聞に遺伝子組換え蚊の記事が掲載された。イギリス企業オクシテック社が開発したオスの遺伝子組換え蚊 6000 匹をデング熱対策としてマレーシアの森林に放ったことが報じられた。今後もこのような計画が立てられる可能性がある。このような遺伝子組換え蚊が食料に混入する懸念がある。今後の動向を注目する必要がある。

(2) LoxP 配列を検知する方法の作成
LoxP 配列をゲノムに導入した GM
ニワトリの ES 細胞、 $1\sim 2 \times 10^6$ 個
から約 30 μg のゲノミック DNA が
抽出された。0.8 %アガロースゲル

電気泳動で分析すると、得られたゲノミック DNA は大部分が 23 kb 以上の大きさだった。今後は得られたゲノミック DNA を使ってアダプターライゲーション法の条件検討を行う予定である。

D. 結論

非食用バイオテクノロジー応用魚と動物についての今回の文献調査では多くの論文報告が見出された。特に魚で遺伝子機能の研究を目的とする報告が多かった。鶏卵をバイオリアクターとして利用する、あるいはブタの臓器を臓器移植に利用するには乗り越えなければならない障壁がまだ残っており、さらなる研究が必要である。したがって、今後すぐに非食用バイオテクノロジー応用魚と動物が大量に作成される状況には至っていないと思われる。

しかし、近年ではニワトリやブタへの遺伝子導入法の研究が活発になされている。近い将来に遺伝子組換え体を作成する技術が大きく進んで高い効率で組換え体を作成できるようになるとと思われる。

また、遺伝子組換え魚や動物を作成する技術は新しい手法が利用されるようになって成熟しつつある。最近では Cre / LoxP システムを使って組換え体を作成するときに使った抗生物質耐性遺伝子を組換え体のゲノムから除去する傾向がある。非食用バイオテクノロジー応用生物を検知するための方法もこれらの新しい傾向に対応する必要がある。本研究では LoxP 配列をゲノムに導入し

た GM ニワトリの ES 細胞を使って LoxP 配列を検知するためのモデル実験を行う。

今後も非食用バイオテクノロジー応用魚や動物の開発状況について調査を行い、それらの検知法を考えたい。

E. 健康危害情報

なし

F. 研究発表

なし

参考論文

非食用バイオテクノロジー応用魚に関する論文 (表 1)

- (1) Zhong J., Wang Y. and Zhu Z. (2002) Introduction of the Human Lactoferrin Gene into Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) to Increase Resistance against GCH Virus. *Aquaculture* 214: 93-101
- (2) Sun L., Xu W., He J. and Yin Z. (2010) In vivo alternative assessment of the chemicals that interfere with anterior pituitary POMC expression and internal steroidogenesis in POMC : EGFP transgenic zebrafish. *Toxicol. Apply. Pharmacol.* 248 (3) 217-25
- (3) Ishtiaq Ahmed A.S., Xiong F., Pang S.C., He M.D., Waters M.J., Zhu Z.Y. and Sun Y.H. (2010) Activation of GH signaling and GH-independent stimulation of growth in zebrafish by introduction of a constitutively activated GHR construct. 印刷中

- (4) Wan G. and Chan K.M. (2010) A study of somatolactin actions by ectopic expression in transgenic zebrafish larvae. *J. Mol. Endocrinol.* 45 (5) 301-15
- (5) Guan B., Ma H., Wang Y., Hu Y., Lin Z., Zhu Z. and Hu W. (2010) Vitreoscilla hemoglobin (VHb) overexpression increases hypoxia tolerance in zebrafish (*Danio rerio*). *Mar. Biotechnol.* 印刷中
- (6) Tang J.Y., Li S., Li Z.H., Zhang Z.J., Hu G., Cheang L.C., Alex D., Hoi M.P., Kwan Y.W., Chan S.W., Leung G.P. and Lee S.M. (2010) Calycosin promotes angiogenesis involving estrogen receptor and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in zebrafish and HUVEC. *PLoS One* 5 (7) e11822
- (7) Zeng Z., Liu X., Seebah S. and Gong Z. (2005) Faithful expression of living color reporter genes in transgenic medaka under two tissue specific promoters. *Developmental Dynamics* 234: 387-392
- (8) Gong Z., Wan H., Tay T.L., Wang H., Chen M. and Yan T. (2003) Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308 (1) 58-63
- (9) Pohajdak B., Mansour M., Hrytsenko O., Colon J.M., Dymond L.C. and Wright J.R. Jr. (2004) Production of transgenic tilapia with Brockmann bodies secreting [desThrB30] human insulin. *Transgenic Res.* 13 (4) 313-23
- (10) Hwang G., Müller F., Rahman M.A., Williams D.W., Murdock P.J., Pasi K.J., Goldspink G., Farahmand H. and Maclean N. (2004) Fish as bioreactors: transgenic expression of human coagulation factor VII in fish embryos. *Mar. Biotechnol.* 6 (5) 485-492
- (11) Yazawa R., Hirono I. and Aoki T. (2006) Transgenic zebrafish expressing chicken lysozyme show resistance against bacterial diseases. *Transgenic Res.* 15 (3) 385-391
- (12) Sarmasik A., Warr G. and Chen T.T. (2002) Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens. *Mar. Biotechnol.* 4 (3) 310-322
- (13) Li S., and Tsai H. (2009) Transgenic microalgae as a non-antibiotic bactericide producer to defend against bacterial pathogen infection in the fish digestive tract. *Fish and Shellfish Immunology* 26, 316-325
- (14) Hew C.L., Fletcher G.L. and Davies P.L. (1995) Transgenic salmon: tailoring the genome for food production. *J. Fish Biol.* 1995 47 (Suppl. A) 1-19
- (15) Kurauchi K., Nakaguchi Y., Tsutsumi M., Hori H., Kurihara R., Hashimoto S., Ohnuma R., Yamamoto Y., Matsuoka S., Kawai S., Hirata T. and

- Kinoshita M. (2005) In vivo visual reporter system for detection of estrogen-like substance by transgenic medaka. *Environmental Sci. Technol.* 39 2762-69
- (16) Santoriello C. et al. (2010) Kita driven expression of oncogenic HRAS leads to early onset and highly penetrant melanoma in zebrafish. *PLoS One* 5 (12) e15170
- (17) Gill J.A. et al. (2010) Enforced expression of simian virus 40 large T-antigen leads to testicular germ cell tumors in zebrafish. *Zebrafish* 7 (4) 333-41
- (18) Bian Y.H. et al. (2010) Development of a transgenic zebrafish model expressing GFP in the notochord, somite and liver directed by the hfe2 gene promoter. *Transgenic Res.* 印刷中
- (19) Knopf F. et al. (2010) Dually inducible TetON systems for tissue-specific conditional gene expression in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (46) 19933-38
- (20) Zhou W. et al. (2010) Characterization of mesonephric development and regeneration using transgenic zebrafish. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 299 (5) F1040-47
- (21) Ramachandran R. et al. (2010) Conditional gene expression and lineage tracing of tuba1a expressing cells during zebrafish development and retina regeneration. *J. Comp. Neurol.* 518 (20) 4196-212
- (22) Kawakami K. et al. (2010) zTrap: zebrafish gene trap and enhancer trap database. *BMC. Dev. Biol.* 10 105
- (23) Ariga J. et al. (2010) Multicolor time-lapse imaging of transgenic zebrafish: visualizing retinal stem cells activated by targeted neuronal cell ablation. *J. Vis. Exp.* (43) pii2093
- (24) Aghaallaei N., Bajoghli B., Schwarz H., Schorpp M. and Boehm T. (2010) Characterization of mononuclear phagocytic cells in medaka fish transgenic for a *cxcr3a:gfp* reporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (42) 18079-84
- (25) Wang X., Huang L., Li Y., Li X., Li P., Ray J. and Li L. (2011) Characterization of GFP-tagged GnRH-containing terminalis neurons in transgenic zebrafish. *J. Cell Physiol.* 226 (3) 608-15
- (26) Fett M.E., Pilsel A., Paquet D., van Bebber F., Haass C., Tatzelt J., Schmid B. and Winklhofer K.F. (2010) Parkin is protective against proteotoxic stress in transgenic zebrafish model. *PLoS One* 5 (7) e11783
- (27) Ramakrishnan S. et al. (2010) Acquisition of spontaneous electrical activity during embryonic development of gonadotropin-releasing hormone-3 neurons located in the terminal nerve

- of transgenic zebrafish (*Danio rerio*).
Gen. Comp. Endocrinol. 168 (3) 401-7
- (28) Yeh L.K. et al. (2010) Knockdown of zebrafish lumican gene (*zlum*) causes sclera thinning and increased size of sclera coats. J. Biol. Chem. 285 (36) 28141-55
- (29) Walters K.B. et al. (2010) Live imaging of neutrophil motility in a zebrafish model of WHIM syndrome. Blood 116 (15) 2803-11
- (30) Suehiro Y. et al. (2010) Transient and permanent gene transfer into the brain of the teleost fish medaka (*Oryzias latipes*) using human adenovirus and the Cre-loxP system. FEBS Lett. 584 (16) 3545-49
- (31) Xie J. et al. (2010) A novel transgenic zebrafish model for blood-brain and blood-retinal barrier development. BMC Dev. Biol. 10: 76
- (32) Hsieh J.C., Pan C.Y. and Chen J.Y. (2010) Tilapia hepcidin (TH) 2-3 as a transgenic fish enhances resistance to *Vibrio vulnificus* infection and causes variations in immune-related genes after infection by different bacterial species. Fish Shellfish Immunol. 29 (3) 430-39
- (33) Gabillard J.C., Ralliere C., Sabin N. and Rescan P.Y. (2010) The production of fluorescent transgenic trout to study in vitro myogenic cell differentiation. BMC Biotechnol. 17; 10: 39
- (34) Medeiros E.F., Phelps M.P., Fuentes F.D. and Bradley T.M. (2009) Overexpression of follistatin in trout stimulates increased muscling. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 297 (1) R235-42
- (35) Collares T., Campos V.F., Seixas F.K., Cavalcanti P.V., Dellagostin O.A., Moreira H.L. and Deschamps J.C. (2010) Transgene transmission in south America catfish (*Rhamdia quelen*) larvae by sperm-mediated gene transfer. 35 (1) 39-47

表 1 の略語

GCH: grass carp haemorrhage, GH: growth hormone, GHR: growth hormone receptor, IGF: insulin-like growth factor, GFP: green fluorescent protein, YFP: yellow fluorescent protein, RFP: red fluorescent protein, mylz2: myosin, light polypeptide 2, skeletam muscle, krt8: keratin 8, NTR: nitroreductase, Gal4FF: engineered yeast Gal4 transcription factor, GnRH: gonadotropin releasing hormone, WHIM: warts, hypo-gammaglobulinemia, infectious and myelokathexis, CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4, dsRed: *Discosoma sp*-derived red fluorescent protein

非食用バイオテクノロジー応用ニワトリに関する論文 (表 2)

- (1) Kwon M.S., Koo B.C., Choi B.R., Park Y.Y., Lee Y.M., Suh H.S., Park Y.S., Lee H.T., Kim J.H., Roh J.Y., Kim N.H. and Kim T. (2008) Generation of transgenic chickens that produces

- bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Mol. Reprod. Dev.* 75 (7) 1120-6
- (2) Kodama D., Nishimiya D., Iwata K., Yamaguchi K., Yoshida K., Kawabe Y., Motono M., Watanabe H., Yamashita T., Nishijima K., Kamihira M. and Iijima S. (2008) Production of human erythropoietin by chimeric chickens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367 (4) 834-9
- (3) Lee S.H., Gupta M.K., Han D.W., Han S.Y., Uhm S.J., Kim T. and Lee H.T. (2007) Development of transgenic chickens expressing human parathormone under the control of a ubiquitous promoter by using a retrovirus vector system. *Poult Sci.* 86 (10) 2221-7
- (4) Koo B.C., Kwon M.S., Choi B.R., Kim J.H., Cho S.K., Sohn S.H., Cho E.J., Lee H.T., Chang W., Jeon I., Park J.K., Park J.B. and Kim T. (2006) Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J.* 20, 2251-60
- (5) Kamihira M., Ono K., Esaka K., Nishijima K., Kigaku R., Komatsu H., Yamashita T., Kyogoku K. and Iijima S. (2005) High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *J. Virol.* 79 (17) 10864-74
- (6) Mozdziak P.E., Borwornpinyo S., McCoy D.W. and Petitte J.N. (2003) Development of transgenic chickens expressing bacterial beta-galactosidase. *Dev. Dyn.* 226 (3) 439-45
- (7) Rapp J.C., Harvey A.J., Speksnijder G.L., Hu W. and Ivarie R. (2003) Biologically active human interferon alpha-2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Res.* 12 (5) 569-75
- (8) Harvey A.J. and Ivarie R. (2003) Validating the hen as a bioreactor for the production of exogenous proteins in egg white. *Poult Sci.* 82 (6) 927-30
- (9) Zhu L. et.al. (2005) Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat. Biotechnol.* 23 (9) 1159-69
- (10) Minematsu T., Harumi T. and Naito M. (2008) Germ cell-specific expression of GFP gene induced by chicken vasa homologue (Cvh) promoter in early chicken embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 75 (10) 1515-22
- (11) Li B., Sun G., Sun H., Xu Q., Gao B., Zhou G., Zhao W., Wu X., Bao W., Yu F., Wang K. and Chen G. (2008) Efficient generation of transgenic chickens using the spermatogonial stem cells in vivo and ex vivo transfection. *Sci. China C. Life Sci.* 51 (8) 734-42
- (12) Kyogoku K., Yoshida K., Watanabe H., Yamashita T., Kawabe Y., Motono M.,

- Nishijima K., Kamihira M. and Iijima S. (2008) Production of recombinant tumor necrosis factor receptor / Fc fusion protein by genetically manipulated chickens. *J. Biosci. Bioeng.* 105 (5) 454-9
- (13) Kawabe Y., Naka T., Komatsu H., Nishijima K., Iijima S. and Kamihira M. (2008) Retroviral gene transduction into chicken embryo gonads through blood circulation. *J. Biosci. Bioeng.* 106 (6) 598-601
- (14) Kamihira M., Kawabe Y., Shindo T., Ono K., Esaka K., Yamashita T., Nishijima K. and Iijima S. (2009) Production of chimeric monoclonal antibodies by genetically manipulated chickens. *J. Biotechnol.* 141 (1-2) 18-25
- (15) Smith C.A., Roeszler K.N. and Sinclair A.H. (2009) Robust and ubiquitous GFP expression in a single generation of chicken embryos using the avian retroviral vector, RCASBP. *Differentiation.* 77 (5) 473-82
- (16) Harel-Markowitz E., Gurevich M., Shore L.S., Katz A., Stram Y. and Shemesh M. (2009) Use of sperm plasmid DNA lipofection combined with REMI (restriction enzyme-mediated insertion) for production of transgenic chickens expressing eGFP (enhanced green fluorescent protein) or human follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.* 80 (5) 1046-52
- (17) Penno C.A., Kawabe Y., Ito A. and Kamihira M. (2010) Production of recombinant human erythropoietin / Fc fusion protein by genetically manipulated chickens. *Transgenic Res.* 19 (2) 187-95
- (18) Lu Y., Lin C. and Wang X. (2009) PiggyBac transgenic strategies in the developing chicken spinal cord. *Nucleic Acids Res.* 37 (21) e141
- (19) Koo B.C., Kwon M.S., Lee H., Kim M., Kim D., Roh J.Y., Park Y.Y., Cui X.S., Kim N.H., Byun S.J. and Kim T. (2009) Tetracycline-dependent expression of the human erythropoietin gene in transgenic chickens. *Transgenic Res.* 19 (3) 437-47
- (20) Nakamura R. et al. (2010) Allergenicity study of EGFP-transgenic chicken meat by serological and 2D-DIGE analysis. *Food Chem. Toxicol.* 48 (5) 1302-10
- (21) Kim J.N. et al. (2010) Migration and proliferation of intact and genetically modified primordial germ cells and the generation of a transgenic chicken. *Biol. Reprod.* 82 (2) 257-62
- (22) McGrew M.J. et al. (2010) Functional conservation between rodents and chicken of regulatory sequences driving skeletal muscle gene expression in transgenic chickens. *BMC Dev. Biol.* 10 26
- (23) Motono M. et al. (2010) Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a

lentiviral vector. *J. Biosci. Bioeng.* 109 (4) 315-21

- (24) Park S.H. et al. (2010) CpG methylation modulates tissue-specific expression of a transgene in chickens. *Theriogenology* 74 (5) 805-16.e1.

表 2 の略語

MoMLV: Moloney murine leukemia virus, RSV: Rous sarcoma virus, Cvh: chicken vasa homologue, EGFP, eGFP: enhanced green fluorescent protein, SV40: simian vacuolating virus 40, CMV: cytomegalovirus, TNF: tumor necrosis factor, IgG: immunoglobulin G, WPRE: woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulation element, LTR: long terminal repeat, FSH: follicle-stimulating hormone, DsRed: red fluorescent protein, shRNA: small hairpin RNA, GFAP: glial fibrillary acidic protein, CAG: CMV enhancer / chicken- β -actin promoter, PGC: primordial germ cells, MLC3: myosin light chain 3

非食用バイオテクノロジー応用ブタに関する論文 (表 3)

- (1) Miyagawa S. et al. (2001) Remodeling of the major pig xenoantigen by N-acetylglucosaminyltransferase III in transgenic pig. *J. Biol. Chem.* 276 (42) 39310-19
- (2) Murakami H. et al. (2002) Transgenic pigs expressing human decay-accelerating factor regulated by porcine MCP gene promoter. *Mol.*

Reprod. Dev. 61 (3) 302-11

- (3) Loveland B.E., Milland J., Kyriakou P. et al. (2004) Characterization of a CD46 transgenic pig and protection of transgenic kidneys against hyperacute rejection in non-immunosuppressed baboons. *Xenotransplantation* 11 171-83
- (4) Takahagi Y., Fujimura T., Miyagawa S., Nagashima H., Shigehisa T., Shirakura R. and Murakami H. (2005) Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase III. *Mol. Reprod. Dev.* 71 (3) 331-8
- (5) Ayares D., Phelps C.J., Vaught T.D. and Ball S. (2007) Genetic engineering of pigs for improved transplant outcomes. *Xenotransplantation* 14 428
- (6) Dieckhoff B., Petersen B., Kuess W.A., Kurth R., Niemann H. and Denner J. (2008) Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs. *Xenotransplantation* 15 (1) 36-45
- (7) Matsunari H., Onodera M., Tada N., Mochizuki H., Karasawa S., Haruyama E., Nakayama N., Saito H., Ueno S., Kurome M., Miyawaki A. and Nagashima H. (2008) Transgenic-cloned pigs systemically expressing red fluorescent protein,

- Kusabira-Orange. Cloning Stem Cells. 10 (3) 313-23
- (8) Weiss E.H., Lilienfeld B.G., Müller S., Müller E., Herbach N., Kessler B., Wanke R., Schwinzer R., Seebach J.D., Wolf E. and Brem G. (2009) HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: protection against xenogenic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity. *Transplantation* 87 (1) 35-43
- (9) Ramsoondar J., Vaught T., Ball S., Mendicino M., Monahan J., Jobst P., Vance A., Duncan J., Wells K. and Ayares D. (2009) Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *Xenotransplantation* 16 (3) 164-80
- (10) Phelps C.J., Ball S.F., Vaught T.D., Vance A.M., Mendicino M., Monahan J.A., Walters A.H., Wells K.D., Dandro A.S., Ramsoondar J.J., Cooper D.K. and Ayares D.L. (2009) Production and characterization of transgenic pigs expressing porcine CTLA4-Ig. *Xenotransplantation* 16 (6) 477-85
- (11) Petersen B., Ramackers W., Tiede A., Lucas-Hahn A., Herrmann D., Barg-Kues B., Schuettler W., Friedrich L., Schwinzer R., Winkler M. and Niemann H. (2009) Pigs transgenic for human thrombomodulin have elevated production of activated protein C. *Xenotransplantation* 16 (6) 486-95
- (12) Oropeza M., Petersen B., Carnwath J.W., Lucas-Hahn A., Lemme E., Hassel P., Herrmann D., Barg-Kuess B., Holler S., Queisser A.L., Schwinzer R., Hinkel R., Kupatt C. and Niemann H. (2009) Transgenic expression of the human A20 gene in cloned pigs provides protection against apoptic and inflammatory stimuli. *Xenotransplantation* 16 (6) 522-34
- (13) Lee H., Lee B., Kim Y., Paik N. and Rho H. (2010) Characterization of transgenic pigs that express human decay accelerating factor and cell membrane-tethered human tissue factor pathway inhibitor. *Reprod. Domest. Anim.* 印刷中
- (14) Ahn K.S., Won J.Y., Park J.K., Sorrell A.M., Heo S.Y., Kang J.H., Woo J.S., Choi B.H., Chang W.K. and Shim H. (2010) Production of human CD59-transgenic pigs by embryonic germ cell nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400 (4) 667-72
- (15) Naruse K., Ishikawa H., Kawano H.O., Ueda H., Kurome M., Miyazaki K., Endo M., Sawasaki T., Nagashima H. and Makuuchi M. (2005) Production of a transgenic pig expressing human albumin and enhanced green fluorescent protein. *J. Reprod. Dev.* 51 (4) 539-546
- (16) Kurome M., Ueda H., Tomii R., Naruse K. and Nagashima H. (2006) Production of transgenic-clone pigs by the combination of ICSI-mediated gene transfer with somatic cell nuclear

- transfer. *Transgenic Res.* 15 229-240
- (17) Lee H.G., Lee H.C., Kim S.W., Lee P., Chung H.J., Lee Y.K., Han J.H., Hwang I.S., Yoo J.I., Kim Y.K., Kim H.T., Lee H.T., Chang W.K. and Park J.K. (2009) Production of recombinant human von Willebrand factor in the milk of transgenic pigs. *J. Reprod. Dev.* 55 (5) 484-90
- (18) Kragh P.M., Nielsen A.L., Li J., Du Y., Lin L., Schmidt M., Boegh I.B., Holm I.E., Jakobsen J.E., Johansen M.G., Purup S., Bolund L., Vajta G. and Joergensen A.L. (2009) Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. *Transgenic Res.* 18 (4) 545-58
- (19) Umeyama K., Watanabe M., Saito H., Kurome M., Tohi S., Matsunari H., Miki K. and Nagashima H. (2009) Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1 α induces diabetes in transgenic-cloned pigs. *Transgenic Res.* 18 (5) 697-706
- (20) Renner S., Fehlings C., Herbach N., Hofmann A., von Waldthausen D.C., Kessler B., Ulrichs K., Chodnevskaja I., Moskalenko V., Amselgruber W., Göke B., Pfeifer A., Wanke R. and Wolf E. (2010) Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes* 59 (5) 1228-38
- (21) Yang D., Wang C.E., Zhao B., Li W., Ouyang Z., Liu Z., Yang H., Fan P., O'Neill A., Gu W., Yi H., Li S., Lai L. and Li X.J. (2010) Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Hum. Mol. Genet.* 19 (20) 3983-94
- (22) Park K.W., Choi K.M., Hong S.P., Han G.S., Yoo J.Y., Jin D.I., Seol J.G. and Park C.S. (2008) Production of transgenic re-cloned piglets harboring the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) gene from porcine fetal fibroblasts by nuclear transfer. *Theriogenology* 70 (9) 1431-38
- (23) Cho S.K., Hwang K.C., Choi Y.J., Bui H.T., Nguyen V.T., Park C., Kim J.H. and Kim J.H. (2009) Production of transgenic pigs harboring the human erythropoietin (hEPO) gene using somatic cell nuclear transfer. *J. Reprod. Dev.* 55(2) 128-36
- (24) Garcia-Vazquez F. A., Garcia-Rosello E., Gutierrez-Adan A. and Gadea J. (2009) Effect of sperm treatment on efficiency of EGFP-expressing porcine embryos produced by ICSI-SMGT. *Theriogenology* 72 (4) 506-18
- (25) Garcia-Vazquez F.A., Ruiz S., Matas C., Izquierdo-Rico M.J., Grullon L.A., De Ondiz A., Vieira L., Aviles-Lopez K., Gutierrez-Adan A. and Gadea J. (2010) Production of transgenic piglets

- using ICSI-sperm-mediated gene transfer in combination with recombinase RecA. *Reproduction* 140 (2) 259-72
- (26) Jakobsen J.E., Li J., Kragh P.M., Moldt B., Lin L., Liu Y., Schmidt M., Winther K.D., Schyth B.D., Holm I.E., Vajta G., Bolund L., Callesen H., Jorgensen A.L., Nielsen A.L. and Mikkelsen J.G. (2010) Pig transgenesis by Sleeping Beauty DNA transposition. *Transgenic Res.* 印刷中
- (27) Kurome M., Ishikawa T., Tomii R., Ueno S., Shimada A., Yazawa H. and Nagashima H. (2008) Production of transgenic and non-transgenic clones in miniature pigs by somatic cell nuclear transfer. *J. Reprod. Dev.* 54 (3) 156-63
- (28) Chang C.H., Chou T.K., Yang C.Y., Chang T.J., Wu Y.H. and Lee T.W. (2008) Biodistribution and pharmacokinetics of transgenic pig-produced recombinant human factor IX (rhFIX) in rats. *In Vivo* 22 (6) 693-97
- (29) Li L., Pang D., Wang T., Li Z., Chen L., Zhang M., Song N., Nie D., Chen Z., Lai L. and Ouyang H. (2009) Production of a reporter transgenic pig for monitoring Cre recombinase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382 (2) 232-35
- (30) Kong Q., Wu M., Huan Y., Zhang L., Liu H., Bou G., Luo Y., Mu Y. and Liu Z. (2009) Transgene expression is associated with copy number and cytomegalovirus promoter methylation in transgenic pigs. *PLoS One* 4 (8) e6679
- (31) Kawarasaki T., Uchiyama K., Hirao A., Azuma S., Otake M., Shibata M., Tsuchiya S., Enosawa S., Takeuchi K., Konno K., Hakamata Y., Yoshino H., Wakai T., Ookawara S., Tanaka H., Kobayashi E. and Murakami T. (2009) Profile of new green fluorescent protein transgenic Jinhua pigs as an imaging source. *J. Biomed. Opt.* 14 (5) 054017
- (32) Trzcinska M., Bryla M., Bochenek M., Slomski R. and Smorag Z. (2009) Assessment of plasma membrane and chromatin structure of sperm from transgenic and non-transgenic boars. *Theriogenology* 72 (8) 1141-47.
- (33) Bryla M., Tizcinska M., Wiczorek J., Slomski R. and Smorag Z. (2010) Effect of semen quality in transgenic boars on the developmental competence of preimplantation embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 118 (1) 77-82
- (34) Tong J., Wei H., Liu X., Hu W., Bi M., Wang Y., Li Q. and Li N. (2010) Production of recombinant human lysozyme in the milk of transgenic pigs. *Transgenic Res.* 印刷中
- (35) McCalla-Martin A.C., Chen X., Linder K.E., Estrada J.L. and Piedrahita J.A. (2010) Varying phenotypes in swine

- versus murine transgenic models constitutively expressing the same human Sonic hedgehog transcriptional activator, K5-HGLI2 Delta N. *Transgenic Res.* 19 (5) 869-87
- (36) Tang M., Zheng X., Cheng W., Jin E., Chen H., Yang S., Cui W. and Li K. (2010) Safety assessment of sFat-1 transgenic pigs by detecting their co-habitant microbe in intestinal tract. *Transgenic Res.* 印刷中
- (37) Whyte J. and Laughlin M.H. (2010) Placentation in the pig visualized by eGFP fluorescence in eNOS over-expressing cloned transgenic swine. *Mol. Reprod. Dev.* 77 (7) 565.
- (38) Nowak-Imialek M., Kues W.A., Petersen B., Lucas-Hahn A., Herrmann D., Meena Haridoss S., Oropeza M., Lemme E., Schöler H.R., Carnwath J.W. and Niemann H. (2010) Oct4-EGFP transgenic pigs – a new large animal model for reprogramming studies. *Stem Cells Dev.* 印刷中
- immunoglobulin, HLA: human leukocyte antigen, EG: embryonic germ, PDGF β : platelet-derived growth factor β , Ins2: insulin-2, pgk: phosphoglycerate kinase, neo: neomycin-resistant gene, sFat-1: synthesized fatty acid desaturase-1, NOS: nitric oxide synthase, Oct4: octamer-binding transcription factor

表 3 の略語

GnTIII: β -d-mannoside
 β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III,
 α -Gal: Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R, hDAF:
human decay-accelerating factor, CD46:
cluster of differentiation 46, IRES:
internal ribosomal entry site, hyg:
hygromycin B, hTFI: human tissue factor
pathway inhibitor, CTLA4: cytotoxic
T-lymphocyte antigen-4, Ig:

区分	導入遺伝子	魚の種類	生体での機能等	研究・開発国	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカー	備考	文献
中国の研究	ヒトラクトフェリン	ソウギョ	GCHウイルスへの耐性が強化された	中国	リニアールにしたプラスミドを精子へエレクトロポレーションして、この精子を人工的に受精させた	pUC118	コイβ-アクチンプロモーター		なし		1
	EGFP	ゼブラフィッシュ	デキサメタゾン、アミノグルチチミドを投与すると下巻体の副腎皮質刺激ホルモン分泌細胞において導入遺伝子の発現量が変化した。	中国 Graduate Univ. of Chinese Academy of Sciences			プロピオメラノコルチンプロモーター			内分泌かく乱の視床下部・下垂体・副腎軸への効果を評価するために利用できる	2
	GH、GHR、C末端の欠けたΔGHRの組換え体	ゼブラフィッシュ	GHのシグナル活性化が起きた(GH、GHR)。それを抑制した(DeltaG-GHR)	中国 Institute of Hydrobiology							3
	ソマトラクチンα、β前駆体	ゼブラフィッシュ	IGFs、インシュリン、レプチンなどの転写が増加した	中国 Chinese Univ. of Hong Kong			ゼブラフィッシュβ-アクトチンプロモーター		GFP	ソマトラクチンの役割を調べた	4
	Vitreoscilla hemoglobin	ゼブラフィッシュ	F(2)世代は25%酸素下で生存率が高かった	中国 Institute of Hydrobiology		pCVCG	コイβ-アクチンプロモーター			低酸素状態耐性の魚を作る試み	5
	EGFP、nEGFP	ゼブラフィッシュ	calyocostinを胚に投与すると血管形成が促進された	中国 Univ. of Macau			flil1プロモーター				6
觀賞魚用	GFP	メダカ	蛍光を発する魚を作成した	シンガポール Univ. Singapore			ゼブラフィッシュmyl2プロモーター、krt8プロモーター			研究用としても論じられている	7
	GFP、YFP、RFP	ゼブラフィッシュ	3色の蛍光を発する魚を作成した。蛍光タンパクは筋肉のタンパクの3-17%を占めた。	シンガポール National Univ. Singapore	リニアールにしたプラスミドを1、2細胞期の胚へ顕微注射した	pEGFP-1、pEYFP-1、pdsRed-1 (Clontech社)	内在性myl2プロモーター	SV40ポリA	GFP、YFP、RFP	バイオリアクターとしても論じられている	8
バイオリアクター用	ヒト化したインシュリン	ティラピア	F1世代の血清とβ細胞でヒトインシュリンを抽出した	カナダ Univ. Dalhousie	受精卵へ顕微注射した	なし	内在性インシュリンプロモーター	内在性インシュリンターミネーター	なし		9
	ヒト血液凝固因子VII	ゼブラフィッシュ、アフリカナマス、ティラピア	ヒト血液凝固因子VIIを魚の胚で生産させた	イギリス Univ. Southampton	胚へ顕微注射した		CMVプロモーター	SV40ポリA		医療で利用価値が高いヒトタンパクを生産させた	10
	ニワトリ卵白リゾチーム、GFP	ゼブラフィッシュ	リゾチームタンパクは肝臓で抽出された。組換え魚は病原菌に対する耐性が強化された。	日本 海洋大	受精卵へ顕微注射した	プラスミド pEGF-1 (Clontech社)	日本ヒラメ(カレイ)ケラチン遺伝子プロモーター		GFP		11
耐病性付与	cecropin	メダカ	抗菌生物活性をもつペプチドを生産させた。組換え魚はバクテリアに対する耐性が強化された。	アメリカ Univ. Connecticut	受精直後の卵にエレクトロポレーションした	プラスミド pRC/CMV (5.5 kb, Invitrogen社)	CMVプロモーター		なし		12
	コドン最適化したウンラクトフェリンとDsRedの融合遺伝子	(微細藻類 <i>N. oculata</i>)	組換え藻類を魚に採取させてバクテリアに対する抵抗性を増強させた	台湾 National Taiwan University	<i>N. oculata</i> のプロトプラストにエレクトロポレーションした		ヒートショックプロテイン70Aプロモーターとribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit 2プロモーターを組み合わせたもの		DsRed	魚に直接遺伝子導入しない	13
低温耐性の試み	凍結防止タンパク	大西洋サケ	凍結防止タンパクの前駆体が血清中で抽出された。	カナダ Univ. Toronto	リニアールにしたプラスミドを受精卵へ顕微注射した	プラスミドpUC9	凍結防止タンパク遺伝子プロモーター		凍結防止タンパク遺伝子ターミネーター	なし	14
環境モニター用	GFP	メダカ	GFP蛍光強度とエストロゲン濃度(〜40 nM)の間に比例関係があった	日本 京都大			chorongenin Hプロモーター			エストロゲン様物質を検出する新しい技術であるメラームの形成を継続的に観察するためのモデル動物を作った	15
研究用	GFP-RAS	ゼブラフィッシュ	適度な色素沈着が起きた	イタリア FIRG Institute of Molecular Oncology			kitaプロモーター				16
	Simian virus 40 large T-抗原、ゼブラフィッシュ幹細胞白血病遺伝子	ゼブラフィッシュ	精巣胚細胞腫瘍ができた	米国 National Cancer Institute			フグ白血球特異的タンパクチロシンカインースプロモーター			精巣胚細胞腫瘍のモデル魚を作った	17
	GFP	ゼブラフィッシュ	導入遺伝子は胚の腎臓、体節、背鰭筋、肝臓で発現した	米国 Univ. of Maryland School of Medicine			ゼブラフィッシュhfe2遺伝子の5'非翻訳領域			hfe2の発現パターンを調べた	18

表1 非食用バイオテクノロジー応用魚を作成した研究報告

区分	導入遺伝子	魚の種類	生体での機能等	研究・開発団	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカ	備考	文献
研究用	変異グルコシルトランスフェラーゼのリガンド結合領域、エクソドメイン	ゼブラフィッシュ	胚と成魚においてコンディショナル、組織特異的な発現させた	ドイツ Technische Univ. Dresden			テトラサイクリンによって誘導できる転写活性化配列				19
	GFP, NTR-mCherry	ゼブラフィッシュ	中腎の間質の細胞で分散して発現した	米国 Univ. of Michigan Health System						ネフロンの形成を時間、空間的に調べた	20
	CreER(T2), loxP-mCherry-loxP-GFP	ゼブラフィッシュ	発生における一過性の発現は神経細胞、骨格筋、心臓、小腸の前駆体で起きた	米国 Univ. of Michigan			tubataプロモーター、 β -アクトチンプロモーター				21
	スプライスアクトセプターとGFPまたはGal4FF、GFPまたはGal4FF	ゼブラフィッシュ	導入遺伝子を特異的な細胞、組織、器官で発現させた	日本 国立遺伝学研究所			hsp70iプロモーター				22
	GFP, YFP		特定の神経細胞を除去したときに活性化される網膜の幹細胞を可視化した	米国 Medical College of Georgia							23
	GFP	メダカ	胚と幼魚において運動性と食餌作用がある細胞で導入遺伝子が発現した	ドイツ Max-Planck Institute of Immunology			ケモカイン受容体cxcr3aプロモーター				24
	GFP	ゼブラフィッシュ	導入遺伝子はterminalis nerveで発現した	米国 Univ. of Notre Dame			GnRH-3プロモーター			terminalis nerveの機能を調べた	25
	ゼブラフィッシュsparkin, そのアンチセンス	ゼブラフィッシュ	タンパク質分解に関する毒性による細胞死から保護する(前者)、その毒性に弱い(後者)	ドイツ Ludwig Maximilians Univ.						ゼブラフィッシュにおけるsparkinの役割を調べた	26
	GFP	ゼブラフィッシュ	胚の発生初期にゴナドトロピン放出ホルモン3神経細胞を同定した	米国 Univ. of California-Los Angeles			ゴナドトロピン放出ホルモン3プロモーター				27
	eGFP, ゼブラフィッシュlumican遺伝子に対するモノクローナル抗体	ゼブラフィッシュ	角膜、強膜、全身で発現した。アンチセンスでは保護効果が大きくなった	台湾 National Taiwan Univ.			lumican遺伝子プロモーター				28
	WHIM変異を持ったCXCR4遺伝子	ゼブラフィッシュ	好中球が造血組織にとどまり、運動性がなくなった	米国 Univ. of Wisconsin-Madison							29
	DaRad2, loxP, EGFP	メダカ	恒常的発現ではレポーター遺伝子は脳において発現した。Cre-loxPシステムが機能した	日本 東大			ヒトタイプ-5A β -アクトチンプロモーター				30
	ビタミンD結合タンパクとEGFPの融合遺伝子	ゼブラフィッシュ	導入遺伝子は内在性レセプターとして血漿で発現した	米国 Cleveland Clinic						血液凝固と血液凝固調節の形成と維持を調べた	31
	テラピアhepcidin 2-3, GFP	ゼブラフィッシュ	一部のバクテリアに対して耐性になった	台湾 Institute of Cellular and Organismic Biology	マイクロインジェクション						32
	GFP	マス	遠隔神経で蛍光を発した	フランス National Institute for Agricultural Research			遠隔神経2プロモーター			魚の骨格筋の成長を調べた	33
	foliastatin	マス	筋肉の成長が増強された	米国 Rhode Island Univ.						myostatinの機能を調べた	34
	EGFP	南アメリカナマス	遺伝子導入法を比較した	ブラジル Federal Univ. of Pelotas	異なる種子を介した遺伝子導入法						35

表 1 非食用バイオテクノロジー応用魚を作成した研究報告(続き)

区分	導入遺伝子	組織タンパクの発現状況等	研究・開発国	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカ	備考	文献
バイオリアクター	ヒト顆粒球刺激因子	大腸菌で発現させたときよりも強い生理活性を持つ組換えタンパクが得られた	韓国 Catholic Univ. Daegu School of Medicine	胚盤黄の下ヘルトロウイルスを注入した	複製欠失のMoMLVを基にしたベクター					1
バイオリアクター	ヒトエリスロポエチン	卵白に高濃度で組換えタンパクが蓄積した	日本 名古屋大	胚の心臓へウイルスを複製注入した	レトロウイルスベクター	ニワトリβ-アクチンプロモーター	WPRE			2
バイオリアクター	ヒト胎芽腫ホリモン	G(1)世代は消化しなかった	韓国 Konkuk Univ.	胚盤黄の段階で胚下腔へウイルスを注入した	複製欠失のMoMLVを基にしたベクター	RSVプロモーター			青箱腫瘍の治療に有用なタンパクを高産した	3
バイオリアクター	eGFP	組織タンパク1 mg当たり0.1 mgのeGFPが発現した	韓国 Catholic Univ. Daegu School of Medicine 他	stageXの胚下腔ヘルトロウイルスを注入した	複製欠失のMoMLVを基にしたベクター	RSVプロモーター	WPRE	eGFP		4
バイオリアクター	抗ブリオン抗体の可変部一本鎖抗体とヒトFc領域の融合遺伝子	血清中で58 mg/mlの組換え抗体が発現した	日本 名古屋大 他	胚の体または心臓へウイルスを複製注入した	VSV-G-偽型包膜と性複製欠失のレトロウイルスベクター	ニワトリβ-アクチンプロモーター			レトロウイルスを胚へ複製注入するタイミングを検討して組換えタンパクを大量に生産させた	5
研究	核移行シグナルIecZ	G(2)世代の細胞核でβ-ガラクトシダーゼが発現した	アメリカ North Carolina State Univ.	胚下腔へウイルスを注入した	複製欠失のレトロウイルスSMTZ vector	SV40 early promoter		IecZ		6
バイオリアクター	ヒトインターフェロンα-2b	卵白に分泌される組換えタンパクは生理活性があった	アメリカ AviGenics, Inc.	胚下腔へウイルスを注入した	複製欠失のレトロウイルスベクター	CMVプロモーター			生理活性のあるタンパクが生産できた	7
バイオリアクター	β-ラクタマーゼ	卵白と血清中でβ-ラクタマーゼが発現した	アメリカ AviGenics, Inc.	胚下腔へウイルスを注入した	複製欠失のレトロウイルスベクター	CMVプロモーター				8
バイオリアクター	ヒトモノクローナル抗体	卵で3 mgの組換え抗体が生産された	アメリカ Origen Therapeutics	ニワトリES細胞にトランスフェクトしてから胚に注入した		オプアルブミン遺伝子プロモーター	オプアルブミン遺伝子の3'側の配列		ニワトリES細胞が使われた	9
研究	ヒト化したGFP	生層細胞において特異的に蛍光を発した	日本 Transgenic Animal Research Center 他	リボソーム-DNA複合体を胚の血管へ注入した	プロモーターを含まないヒト化した組換えGFPレポーターベクター、pHRGFP (Statagene)	Uvhプロモーター		ヒト化したGFP	ニワトリ生層細胞の研究に有用である	10
研究	eGFP	F1, F2世代の肝臓、心臓、腎臓、筋肉において蛍光が観察された	中国 College of Animal Science and Technology 他	プラスミドとカチオン性ポリマーの複合体を精巢へ注入した。精子を集めて人工授精した	pEGFP-N1 (Clontech)	CMVプロモーター	SV40ポリA	eGFP	GMニワトリを作成する新しい方法である	11
バイオリアクター	ヒトTNF受容体2の細胞外ドメインとヒトIgG1のFc領域の融合遺伝子	生理活性のある組換えタンパクが血清と卵黄で発現した	日本 Kaneka Corporation	ウイルスを胚の心臓へ複製注入した	レトロウイルスベクター-pMSCVneo plasmid、Q vector system (Clontech)	ニワトリβ-アクチンプロモーター	WPRE (Q vector system用)	GFP	炎症の治療に応用が期待される	12
研究	β-ガラクトシダーゼ	生層細胞への遺伝子導入効率を高くできる遺伝子注入のタイミングを調べた	日本 九州大 他	レトロウイルスを胚の心臓へ複製注入した	レトロウイルスベクター-pMSCV	ニワトリβ-アクチンプロモーター			β-ガラクトシダーゼ	13
バイオリアクター	ブリオン抗体のH、L鎖、	抗原結合活性を持つモノクローナル抗体を生産させた	日本 九州大 他	レトロウイルスを胚の心臓へ注入した	レトロウイルスベクター-pMSCV (Clontech)	ニワトリβ-アクチンプロモーター		GFP		14
研究	eGFP	胚の体細胞においてeGFPが発現した	オーストラリア Murdoch Childrens Research	レトロウイルスを胚盤黄へ注入した	トリレトロウイルスベクター RCASBP	ウイルスLTR RCASBPプロモーター		eGFP		15
研究	eGFP、ヒトFSH	eGFPは白血球において、ヒトFSHは血清において発現した	イスラエル Koret School of Veterinary Medicine 他	精子へプラスミドと制限酵素をリポフェクションしてから人工授精した	pEGFP-N3 vector (eGFP用、Clontech)、pTarget expression vector (ヒトFSH用、Promega)	CMVプロモーター	SV40ポリA (eGFP用)、SV40 Late ポリA (ヒトFSH用)		高い効率でGMニワトリを作成する方法である	16
バイオリアクター	ヒトエリスロポエチンとヒトIgGのFc領域の融合遺伝子	活性のある組換えタンパクを卵黄から回収した	日本 九州大	レトロウイルスを胚へ複製注入した	pMSCVneo (Clontech)	ニワトリβ-アクチンプロモーター	WPRE	GFP	Fcを付加させたので組換えタンパクが卵黄へ輸送された	17
研究	GFP, DaRed, agrin sh RNA	GFP, DaRed, agrin shRNAを腎臓で発現させた	米国 Northwestern Univ.	PiggyBacトランスポゾンとトランスポゼース遺伝子を胚の腎臓へエレクトロポレーションした	PiggyBacトランスポゾン	CAGプロモーター (GFP, DaRed用)、GFAPプロモーター (GFP用)、ヒトH1プロモーター (agrin sh RNA用)			神経の発生の研究に利用できる	18

表 2 非食用バイオテクノロジー応用ニワトリを作成した研究報告

区分	導入遺伝子	組換えタンパクの発現状況等	研究・開発団	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカ-	備考	文献
研究	ヒトエリスロポエチンとヒトIgGのFc領域の融合遺伝子	組換えタンパクは生理活性があり、G1世代においても発現した	韓国 Catholic Univ. Daegu School of Medicine	レトロウイルスを胚盤黄の下へ注入した	MoMLVを基にしたレトロウイルスベクター				テトラサイクリンによって誘導がかかるプロモーター	19
研究	EGFP	GFPを含めて3つの水溶性タンパクの発現量が変化した	日本 国研研	ES細胞へエレクトロポレーションした後に胚へ移植した	pCAG-EGFP-IPベクター	GAGプロモーター				20
研究	eGFP	PGCに遺伝子導入してGMニワトリを作成した	韓国 Optifarm Solution社	レンチウイルスをPGCに感染させた後に胚の末動脈に注入した	レンチウイルスベクター-pLTReGW					21
研究	LacZ遺伝子	導入遺伝子は骨格筋の連続線で見られた	イギリス Univ. of Edinburgh	ウイルスを産みだすの受精卵に注入した	レンチウイルスベクター-pONY-MLZ				ラットMLC3プロモーター	22
研究	eGFP	導入遺伝子はG(1)世代で強く発現した	日本 名古屋大	PGCに複製不能なレンチウイルスを感染させた後に胚の血液に入れた	レンチウイルスベクター-pLSI/ΔAeGFP	アクチンプロモーター	WPRE			23
研究	eGFP	G(3)世代の血清はホモGMと非GMの間で生化学的に差異なし	韓国 Optifarm Solution社	PGCにレンチウイルスを感染させた後に胚の血管に入れた	レンチウイルスベクター-pLTReGW	Rous sarcoma virusプロモーター	WPRE			24

表 2 非食用バイオテクノロジー応用ニワトリを作成した研究報告(続き)

区分	導入遺伝子	生体での機能等	研究・開発国	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカー	備考	文献
臓器移植用	GnT-III	α -Galの発現が減少した。ヒトの自然抗体への反応性、補体が関与する細胞溶解、細胞性の細胞毒性が低下した	日本 大阪大 他	前核に顕微注射した	なし	β -アクチンプロモーター、CMVプロモーター		なし	糖尿病患者への臓器移植の応用が論じられている	1
	hDAF	内皮細胞がヒト血清による細胞溶解に耐性になった。	日本 The Animal Engineering Research Institute			ブタ臓器因子タンパク遺伝子プロモーター				2
	ヒトCD46	導入遺伝子は全結合で、特に血管内皮細胞で強く発現した	オーストラリア The Austin Research Institute	受精卵に顕微注射した後に卵管に入れた		ヒトCD46プロモーター	SV40ポリA配列		GMPTaの腎臓を免疫抑制剤を使わずにヒトに移植した	3
	IRES-hyg ^r -ポリA遺伝子断片	元のトランスジェニックブタと同等のhDAF、GnT-IIIの発現レベルを示し、 α -Galエピソードの発現は野生型細胞の半分以下だった	日本 The Animal Engineering Research Institute	トランスジェニックブタ胎児の様々な細胞へエレクトロポレーションしてから体細胞核移植を行った	なし	なし	なし	ハイグロマイシンB	hDAFとGnT-III遺伝子を導入したトランスジェニックブタの細胞において α 1,3GT遺伝子をノックアウトした	4
	hTFPI, CD55, CD46, CTLA4-1g		米国 Revivicor社						いずれかのGMPTaが臓器移植に有用かもしれない	5
	ブタ内在性レトロウイルスに保存されている配列に対するshRNA	ブタ内在性レトロウイルスの発現が抑制された	ドイツ Robert Koch Institute 他	レンチウイルスで繊維芽細胞に遺伝子導入してから体細胞核移植を行った	レンチウイルスベクター pLVTHM-pol2	H1ポリメラーゼ IIIHI-RNA遺伝子プロモーター		GFP	ブタ内在性レトロウイルスはヒト細胞に感染するものがある	6
	ヒト化したKusabira-Orange	蛍光タンパクマーカーを導入した細胞は移植した細胞や組織を追跡するために有用である	日本 明治大	レトロウイルスで胎児繊維芽細胞へ遺伝子導入してから体細胞核移植を行った	レトロウイルスベクター D Δ Nsap					7
	HLA-Eのゲノム断片、HLA-B7シグナル配列とヒト β 2-マイクログロブリンのゲノム断片	内皮細胞はヒトNK細胞による細胞障害から守られた	ドイツ LMU Munich	前核への顕微注射	なし	天然のプロモーター	天然のターミネーター			8
	gag-49, pol-106 遺伝子に対するshRNA		米国 Revivicor社	胎児繊維芽細胞にトランスフェクトした後に核移植	pREV801	CAGプロモーター	SV40ポリA配列	GFP, ネオマイシン耐性	臓器移植におけるウイルス感染の抑制を目的	9
	ブタCTLA4とヒトIgG1のヒンジとCH2/CH3領域との融合遺伝子	導入遺伝子は全身で強く発現し、病原菌の急性感染が増えた	米国 Revivicor社	核移植	pCpG-vitro-neo-LacZ (InvivoGen)	ニフトリ β -アクチンプロモーター		ピューロマイシン耐性、ネオマイシン耐性		10
	ヒトスロンボモジュリン-GFP融合遺伝子	導入遺伝子はブタの血液凝固系を乱さずに発現した	ドイツ Institute of Farm Animal Genetics	繊維芽細胞にトランスフェクションした後に、体細胞核移植	pEGFPN1 (Clontech)	CMVプロモーター		ネオマイシン耐性		11
	ヒトA20	導入遺伝子は心筋、骨格筋で発現した	ドイツ Institute of Farm Animal Genetics	胎児繊維芽細胞にトランスフェクトした後に体細胞核移植	pCAGGSEhA20-IRESNEO	ニフトリ β -アクチン/ウサギ β -グロブリンプロモーター		ネオマイシン耐性		12
	hDAF、hTFPI/hCD4 (ヒトTFPIのK1、K2ドメインとヒトCD4のD3、D4ドメインの融合遺伝子)	導入遺伝子は心臓と肝臓で発現した	韓国 Inje Univ.	体細胞核移植		SLTR-PCMVIE、PCMVIE				13
	ヒトCD59	導入遺伝子の発現をmRNA、タンパクレベルで確認した	韓国 Dankook Univ. School of Medicine	EG細胞への核移植	pEGFPN1 (Clontech)	CMVプロモーター		ネオマイシン耐性		14
バイオリアクター用	ヒトアルブミン-eGFP融合遺伝子	肝臓においてヒトアルブミンが発現した	日本 東京大 他	試験管内で成熟させた卵母細胞へ精子ベクター法で遺伝子を導入した	なし	ニフトリ β -アクチンプロモーター		ウサギ β -グロブリンポリAシグナル	eGFP	15

表 3 非食用バイオテクノロジー応用ブタを作成した研究報告

区分	導入遺伝子	生体での機能等	研究・開発国	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカー	備考	文献
バイオリアクター用	ヒトアルブミン-eGFP融合遺伝子	眼球、口粘膜、皮下組織においてeGFPが発現した	日本 明治大	卵細胞質内精子注入法と体細胞核移植を行った	なし	ニフトリβ-アクチンプロモーター	ウサギβ-グロブリンポリAシグナル	eGFP		16
	ヒトvon Willebrand因子	ミルク中で有用物質を生産させた	韓国 National Institute of Animal Science	受精卵に顕微注入	pBluescript	ウシα-S1カゼインプロモーター	ウシ成長ホルモンポリAシグナル			17
病態モデル	スウェーデン組織を有するヒトアミロイド前駆体タンパク遺伝子の神経細胞変異型	導入遺伝子の発現は脳においてmRNA、タンパクレベルで確認された	デンマーク Aarhus Univ.	ミニブタの神経細胞にプラスミドをトランスフェクトした		PDGFβプロモーター			アミロイドβペプチドが脳に蓄積するには1-2年かかると思される	18
	変異型ヒト肝細胞核因子1α	糖尿病の症状を示すブタを作成した	日本 BIOS Research Laboratory Inc.	卵細胞質内精子注入法と体細胞核移植を行った	pBluescript SK(-) (Stratagene)	ブタインシュリンプロモーター	SV40ポリA			19
	慢性阻害グルコース依存性インスリン分泌性ポリペプチド受容体遺伝子	経口でグルコースを投与したときの耐性が低下した	ドイツ LMU Munich	レンチウイルスを受精卵に注入	レンチウイルスベクターLV-pGFP	ラットIns2プロモーター	WPRE		GIPの役割を示した	20
	変異huntingtinのN末端(208アミノ酸)と拡張したポリグルタミン酸(105Q)をコードする遺伝子	脳においてDNAの断片化を伴う神経細胞のアポトーシスが起きた	中国 Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health	初代胎児神経細胞にエレクトロポレーションした後に細胞を選別して体細胞核移植	pCAG-HTT-2A-eGFP	CAGプロモーター		ECFP, ネオマイシン耐性		21
遺伝子導入法の改良	ヒト顆粒球単球コロニー刺激因子	乳腺で発現が強い	韓国 MOGEN社	胎児神経細胞にトランスフェクトした後に核移植		ヤギβカゼインプロモーター	β-カゼイン3'UTRミミックDNA	ネオマイシン耐性	クロニ化した胎児神経細胞を核移植のドナー細胞に使えることを示した	22
	ヒトエリスロポエチン	体細胞核移植後の組換え細胞の選抜法を比較した	韓国 CHO-A Pharmaceutical社	胎児神経細胞にトランスフェクトした後に体細胞核移植	pBC1 (Invitrogen)	ヤギβカゼインプロモーター	βカゼインポリA配列	ネオマイシン耐性		23
	EGFP	精子の処理法を比較して胚発生率を調べた	スペイン Murcia Univ.	精子とDNAをインキュベートした後に卵細胞質内精子注入法	pEGFPN1 (Clontech)	CMV immediate early プロモーター				24
	EGFP	トランスジェニックブタが産まれた	スペイン Murcia Univ.	精子を介した遺伝子導入、顕微授精とリコンビナーゼAの組み合わせ	pEGFPN1 (Clontech)	CMV immediate early プロモーター		EGFP		25
	GFP		デンマーク Aarhus Univ.	神経細胞にトランスポゾンを用させた後に体細胞核移植		ヒトユビキチンCプロモーター				26
その他	GFP-neo融合遺伝子	ミニブタで体細胞核移植を行って仔を作った	日本 明治大	細胞をトランスフェクションしてから体細胞核移植を行った	pOBI-pgk (Chigene)	pgkプロモーター	BGHポリA, SV40ポリA	GFP	ミニブタはブタよりも情報が少ない	27
	ヒト因子IX、ブタラクトフェリン	組換えタンパクは乳腺で発現した	台湾 Institute of Nuclear Energy Research	遺伝子注入と胚移植		ウシα-ラクトアルブミンプロモーター			ブタで作らせたヒト因子IXをラットに投与したときの体内動態を調べた	28
	EGFP, loxP, ネオマイシン耐性	Creリコンビナーゼの活性をin vivoで観察した	中国 Jilin Univ.	胎児神経細胞をトランスフェクトした後に体細胞核移植		CMV プロモーター		ネオマイシン耐性		29

表3 非食用バイオテクノロジー応用ブタを作成した研究報告(続き)

区分	導入遺伝子	生体での機能等	研究・開発国	遺伝子組換え法	ベクター	プロモーター	ターミネーター	マーカー	備考	文献
その他	eGFP	導入遺伝子発現に対するコピー数とプロモーターのメチル化の影響を調べた	中国 Northeast Agricultural Univ. of China	胎児繊維芽細胞にトランスフェクトした後に体細胞核移植	pEGFP-C1 (Clontech)	CMVプロモーター		ネオマイシン耐性		30
	GFP		日本 静岡県家畜技術研	体細胞クローニング						31
	ヒト α 1,2-フコシルトランスフェラーゼ	遺伝子導入によって糖形成は障害を受けなかった	ポーランド National Research Institute of Animal Production	顕微注入	pGT-N29	CMVプロモーター				32
	ヒト α 1,2-フコシルトランスフェラーゼ	GM、非GMブタの糖子はほとんど差がなかった	ポーランド National Research Institute of Animal Production	顕微注入	pGT-N29	CMVプロモーター				33
	ヒトリゾチーム	導入遺伝子をミルク中で発現させた	中国 China Agricultural Univ.	体細胞核移植					仔の生存率を上げる工夫をした	34
	K5-nGli2 Delta N	導入遺伝子を恒常的に皮膚で発現させた	米国 North Carolina State Univ.	体細胞核移植					Gli2の皮膚での機能を調べた	35
	sFat-1	ω -3不飽和脂肪酸を生産する	中国 Institute of Animal Sciences	顕微注入						36
	eGFP, modified porcine eNOS	eNOSを発現させたGMブタにおいて胎盤形成をeGFPによって可視化した	米国 Univ. of Missouri							37
	ネズミOct4-EGFP融合遺伝子	導入遺伝子の発現は胚細胞系列、胚盤胞の内部細胞塊と栄養外胚葉、精巢胚細胞に限定された							リプログラミングをモニターするために有用である	38

表 3 非食用バイオテクノロジー応用ブタを作成した研究報告(続き)