

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の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 23 年度）

遺伝子組換え魚文献検索に関する研究

研究代表者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員

研究要旨：国内外における遺伝子組換え魚類の開発状況を調べる目的で、文献検索、インターネット情報および特許等を調査した。新たに遺伝子組換え魚類としてリゾチーム遺伝子を導入したニジマスや海産魚のイシモチに遺伝子導入した事例が報告された。中国では遺伝子組換え魚の不妊化を行うのに金魚とコイの雑種の中から見つかった 4 倍体を利用して、4 倍体と 2 倍体の交配によって 3 倍体を作成する論文が報告された。遺伝子組換え魚の繁殖特性について遺伝子組換え大西洋サケ、ギンザケおよびコイを用いて報告された。これらの論文では人為的実験環境では正しい評価はできず、なるべく自然環境に似た実験環境で行うべきであると指摘している。そして、自然環境に似せた実験環境を設定し実験を行っている。いずれの実験においても野生魚に比較して遺伝子組換え魚は繁殖特性（餌料競合試験、縄張り試験およびペアリングなど）で劣っている、という結果が得られている。AquaBounty Technologies 社研究部長と面談した結果、新たに情報は得られなかった。しかし、許認可状況が停滞しているなか、同社は新たに生産規模を大きくル施設を作るなど、事業を進めている。

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
増養殖家研究所 養殖技術部

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、2011 年に報告された文献を中心に、組換え魚類について検索を行った。また、本年度は AquaBounty Technologies 社に訪問する機会があったので、開発担当者にインタビューして、遺伝子組換え大西洋サケの開発経過および現在の申請状況について調査した。

C. 研究結果

2011 年に報告された論文の中で、メダカやゼブラフィッシュを用いた実験以外で、新たに作出された遺伝子組換え魚類として、ニジマス（リゾチーム遺伝子挿入）、イシモチ（海産魚、蛍光色素）、ティラピア（マダイの 1 種とアルテミア（甲殻類、餌料生物）のゲノム DNA 挿入）等が報告された。

Fletcher *et al.* (2011) は自然免疫系において重要な役割を果たすリゾチーム（ニジマス由来）cDNA の 5' 側に遺伝子組換え大西洋サケの作出でも用いた Ocean pout 不凍タンパクプロモーターをつなげた導入遺伝子（opAFP-rtLys）を構築し、大西洋サケに導入した。このリゾチーム cDNA を導入した遺伝子組換え大西洋サケは耐病性の付与を目的としたものである。本論文ではこの遺伝子組換え大西洋サケを F2 世代まで飼育し、導入リゾチームの発現とリゾチーム活性がコントロールに比べ 40% 上昇したことを報告している。しかし、実際に病原菌を用いた攻撃し検討の結果は、記載されておらず、今後は不特定多数の業現金に対する抵抗性に関する実験結果を示した方が期待される。

Yamamoto *et al.* (2011) は海産魚であるイシモチに蛍光色素を発現するベクターを導入して、遺

伝子組換えイシモチを作出したことを報告した。これは蛍光を発するイシモチを作るのが目的で無く、魚類で遺伝子導入魚を作出する際に用いられる呪法はマイクロインジェクションが主であるが、これは海産魚のように非常に小さい卵に用いることは難しく、これまであまり行われてこなかったが、今後、海産魚に対するマイクロインジェクション法を確立する必要があることから、研究を行ったと、その目的に述べられている。610 粒にマイクロインジェクションし、生存して残った個体のうち、426 尾(69.8%)がモザイク状に導入遺伝子が観察され、雌雄 3 尾の親から遺伝子組換えイシモチが作出されたことを報告している。著者らはこれらの技術を確立することで、陸上養殖で飼育されるような海産魚を念頭に、これらの技術の応用を目指している。

一方、今までの常識とは大変変わった報告もなされている。それはアレクサンドリア大学の *Ei-Zaeem et al.* (2011) 等が報告している論文で、マダイ(海産魚)とアルテミア(甲殻類の一種、餌料動物として利用されている)の核 DNA を制限酵素(Eco RI)で断片化し、この断片を、注射器を使ってティラピア生殖巣に注射し、遺伝子組換えティラピアを作出したと報告している。どんな遺伝子が導入されたか、また、導入されているか不明であるが、コントロールに比べ、成長特性と餌料効率に有意な差があることを報告している。また、海産魚の遺伝子を導入したことから遺伝子組換えティラピアに塩分耐性が導入されたか調べ、コントロールに比べ有意な差があったことも報告している。信憑性は疑わしいが、もし、この方法で遺伝子組換え魚が作出されるなら、入った遺伝子も、どんな遺伝子によって効果があるのかも全く不明であり、多くの問題を含んでいる。

本年度も中国の研究者が報告した遺伝子組換え魚に関する論文は多数出版された。*Xi et al.* (2011) はフォリスタチン 1 遺伝子をゼブラフィッシュに導入し、骨格筋の筋原繊維の発達を観察した。結果的に成長の良いゼブラフィッシュを作出したことを報告している。本研究はフォリスタチン 1 遺伝子の働きを調べる基礎研究として、遺伝子組換えゼブラフィッシュを作出したものだが、同じ遺伝子を用いてニジマスで大きくなる遺伝子組換えニジマスも研究されている(インターネット

情報)。同コンストラクトを他の魚に用いれば、成長ホルモン遺伝子導入と同じような効果が得られると推定される。また、中国ではコイを中心に遺伝子組換え魚が作出されているが、Black carp の β アクチンプロモーターと成長ホルモン cDNA を日本の金魚(Japanese crucian carp)に導入した遺伝子組換え魚を作出している(*Feng et al.* (2011))。これは金魚を食用にするために作出しているわけで無く、金魚とコイの交配の子孫の中に 4 倍体が出現することが *Liu et al.* (2001) によって報告されており、このことを利用して、遺伝子導入した金魚とコイを受精させ、遺伝子組換え導入 4 倍体雑種を作出し、これを親魚としてコイと受精させ、3 倍体を作成し不妊化した遺伝子組換えコイ(正確には雑種)を利用しようとするものである。

遺伝子組換え魚の特性(行動、生態、繁殖等)に関する論文もいくつか報告されている。

Duan et al. (2011) は遺伝子組換えコイ幼魚を用いて、同じサイズのコントロールを用いて説示行動を観察した。給餌中はコントロールに比べ約 2.7 倍活発な行動を取り、餌は 1.7 倍食べた。8 日間の試験期間中 4.1 倍の成長率を示し、血中の成長ホルモン量は 6.4 倍示した。これらのことが成長ホルモン遺伝子を導入したコイの高成長の理由であるが、これらのデータは人工的に設定した環境中のことであり、自然界に逃避した遺伝子組換え魚の評価には役立たないであろう、と報告している。*Pennington and Kapuscinski* (2011) は体力的に勝っている成長ホルモン遺伝子導入遺伝子組換え魚は自然界に逃避したとき、自然個体群と交配が起こり、”gene flow; 遺伝子流動“の起こる可能性がある。しかし、これらの評価は人工環境下では無く、自然環境下で評価されるべきである。そこで、成長ホルモン遺伝子導入遺伝子組換えメダカを用いて、餌料環境を変えて、繁殖力、妊性、生存率、性比、成熟率等を比較した。その結果、遺伝子流動のような変化を見ることができず、このような評価を行う場合、全ライフサイクルを通じた評価、いろんな実験環境を取り入れる、同じ系統を使って比較することが重要であると推察された、とある。*Moreau et al.* (2011a) は初めて餌を食べ始める時期の遺伝子組換え大西洋サケとコントロールを用いて縄張り行動を比較した結果、

生活史の初期において遺伝子組換え魚はコントロールの大西洋サケに影響を及ぼさない、と推察した。また、Moreau *et al.* (2011b)配電し組換え大西洋サケ雄の繁殖能力について観察し、非遺伝子組換え雄に比べ繁殖能力が低いことを報告している。しかし、繁殖行動へ参加することは認められたため、次世代に導入遺伝子が継続される可能性はあるとしている。Fitzpatrick *et al.* (2011)は成長ホルモン遺伝子組換えギンザケを用いて、準自然環境を用いて繁殖能力について非組み換えギンザケ(養殖ギンザケと天然由来のギンザケ)と比較して、天然ギンザケ>養殖ギンザケ>遺伝子組換えギンザケの順で勝っていることを観察した、とある。

2011年8月にカナダのプリンスエドワード島(PEI)にあるAquaBounty Technologie社を訪問する機会があった。PEIには飼育施設と研究施設があり、同社のBuchanan研究部長から遺伝子組換え大西洋サケについて説明を受けた。しかし、残念ながら、これまでに公表されているデータ以外は新しい情報は無かった。同氏には、日本に来て講演を行うことを要請し、その後、11月に農水省において講演を行ってもらった。

D. 考察

本年度は、新たに作られた遺伝子組換え魚の情報、中国の情報、さらに遺伝子組換え魚の特性について調べた論文を紹介した。

近年、海産魚のような小さい卵を使っても遺伝子組換え魚の作出が可能となり、海産魚の遺伝子組換え魚について方向がなされるようになってきた。

中国ではコイを中心に遺伝子組換え魚の作出が行われてきているが、不妊化する方法として3倍体の利用と、3倍体を作成するのに4倍体を利用する論文が報告された。一般に、魚類の4倍体化は難しく、ニジマスのように限られた魚種しか報告例が無い。今回の報告のように異種間の交配によって4倍体が作出されることを利用して3倍体遺伝子組換え魚を作成した報告は初めてである。厳密には、これは金魚とコイの雑種で、コイに戻し交配を繰り返し、遺伝的にコイに近づけていくと思われるが、今後や、このような雑種遺伝子組換え魚の利用も考えられる。

AquaBounty Technologie社へ訪問したが、同社の飼育施設等を確認したことには意味があるが、情報としては今までに報告されているもの以外に新しい情報は無かった。同社も現在FDAで審議されている状況のなかで、身動きが取れない状況と思われた。しかし、パナマに大規模な養殖施設を建設するなど、認可後の動きは確実に進めている。

E. 結論

新しい遺伝子組換え魚の論文は本年度も報告されている。遺伝子組換え魚を用いた繁殖特性を比較した論文では、いずれも野生魚に比較して繁殖能力が劣っている、と言う結果が多い。

AquaBounty Technologie社訪問によって、今までに得られていない情報を得ることはできなかった。

参考インターネットホームページ

1. AquaBounty Technologies社ホームページ ; www.aquabounty.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) www.aquabounty.com/technology/technology-296.aspx
3. 組換え魚に反対している消費者団体の関連ホームページ
The center for food safety ; ge-fish.org

参考文献

4. Fletcher *et al.* (2011). Lysozyme transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research* 42, 427-440.
5. Yamamoto *et al.* (2011). Establishment of a stable transgenic strain in a pelagic egg spawning marine teleost, Nibe croaker *Nibe mitsukurii*. *Aquaculture* 313, 42-49.
6. El-Zaeem *et al.* (2011) Production of salinity tolerant Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* through traditional and modern breeding methods: II. Application of genetically modified breeding by introducing foreign DNA into fish gonads. *African J. Bioltech.* 10(4), 684-695.
7. Xi *et al.* (2011) Enhanced hyperplasia in muscles of transgenic zebrafish expressing Follistatin 1. *Sci. China Life Sci.* 54(2), 159-165.
8. Duan *et al.* (2011) Behavioral alterations in GH

- transgenic common carp may explain enhanced competitive feeding ability. *Aquaculture* 317, 175-181.
9. Li *et al.* (2011) The hematological response to exhaustive in 'all-fish' growth hormone transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 311, 263-268.
 10. Hao *et al.* (2011) The development of P0 of black carp GH gene transgenic Japanese curcian carp. (in Chinese) *Life Sci. Res.* 15, 158-164.
 11. Xu *et al.* (2011) Defining global gene expression changes of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in female sGnRH-antisense transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). *Plos one* 6, 1-12.
 12. Yu *et al.* (2011) Rapid growth and sterility of growth hormone gene transgenic triploid carp. *Chinese Sci. Bull.* 56, 1679-1684.
 13. Feng *et al.* (2011) Black carp growth hormone gene transgenic allotetraploid hybrids of *Carassius auratus* red var. (♀) × *Cyprinus carpio* (♂). *Sci. China Life Sci.* 54, 822-827.
 14. Liu *et al.* (2001) The formation of tetraploid stocks of red curcian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. *Aquaculture* 192, 171-186.
 15. Behavioral alterations in GH transgenic common carp may explain enhanced competitive feeding ability. *Aquaculture* 317, 175-181.
 16. Pennington and Kapuscinski (2011) Predation and food limitation influence fitness traits of growth-enhanced transgenic and wild-type fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 140, 221-224.
 17. Moreau *et al.* (2011) Growth hormone transgenesis does not influence territorial dominance or growth and survival of first-feeding Atlantic salmon *Salmo salar* in food-limited stream microcosms. *Fish Biol.*, 78, 726-740.
 18. Moreau *et al.* (2011) Reproductive performance of alternative male phenotypes of growth hormone transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Evol. Appl.* 4, 736-748.
 19. Fitzpatric *et al.* (2011) Cultured growth hormone transgenic salmon are reproductively out-competed by wild-reared salmon in semi-natural mating arenas. *Aquaculture* 312, 185-191.
 20. Sundstrom and Devlin (2011) Increased intrinsic growth rate is advantageous even under ecologically stressful conditions in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Evol. Ecol.* 25, 447-460.

- 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^{*1}, Hiroyuki OKAMOTO^{*1}, Tetsuji MASAOKA^{*1},
Kazuo ARAKI^{*1}, Shunpei SATO^{*2} and Masatoshi BAN^{*2}

^{*1} National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency

^{*2} 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: hnagoya@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てい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、それをう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種で、ブラウントラウト *Salmo trutta* に最も近い。本来の分布域は MacCrmmmon and Gots¹¹⁾ 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²¹⁾。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³¹⁾。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⁴¹⁾、一生を淡水で過ごす群もいる⁵¹⁾。幼稚魚は体側に8~11個のパーマークと赤点を有するが³¹⁾、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⁶⁻¹⁵⁾。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.*¹⁶⁾ によれば、カナダ大西洋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℃) という特色があつて、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。従つて、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パサマクウォ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.*¹⁶⁾ は長年に亘つ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.*¹⁷⁾ 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¹⁸⁾。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。ウイ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 *Hemitripterus 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¹⁸⁾。

3.2 AFP遺伝子と大西洋サケへの遺伝子導入

Fletcher *et al.*¹⁹⁾ はウイ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²⁰⁾。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²¹⁾。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²⁰⁾。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²²⁾。Fletcher ら²³⁾ 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²⁴⁾

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)²³⁾

Transgene	Production Year	Generation	Cross	Transgene	
				Observed (%)	Expected (%)
AFP* ¹	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* ²	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

*¹AFP means the transgenic Atlantic salmon transgened AFP gene form winter plounder.

*²GH 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の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²⁵⁾

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²⁶⁾

スマルト発達に関する本研究では、ゲンゲ (*Macrozoarces 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、通常の太平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⁺/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にとどまった。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²⁷⁾

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²⁸⁾

ウィンターフラウンダーの不凍タンパク質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質遺伝子(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、しかも季節的変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²⁹⁾

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³⁰⁾

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³¹⁾

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³²⁾

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 O₂/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³³⁾

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³⁴⁾

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、チャンネル式コーン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³⁵⁾

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系統を使用

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³⁶⁾

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 (APF) 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 α) 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 α 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³⁷⁾

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 α) 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と同様であり、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シフェラーゼ発現が70%失われ、一方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 α 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 6th 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 23 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の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 23 年度）

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 客員研究員

研究要旨：平成 22 年度は、*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^r*）を挟み込んだモデル遺伝子組換えベクター（*plex*）を導入したモデル胚性幹細胞（ES 細胞）に対して、*Cre* リコンビナーゼを一過性に発現するベクターの組込みに成功した。そこで平成 23 年度は、*Cre* リコンビナーゼを発現させたモデル ES 細胞において、*GFP* が削除された ES 細胞のクローニングを行った。またこのクローン化 ES 細胞中に 1 コピーの *loxP* 配列の挿入を確認後、この ES 細胞からゲノム DNA を抽出し、平成 22 年度に構築した *loxP* 配列を検出するためのインバース PCR を実施した。その結果、標的ゲノム DNA を鋳型にした場合において、明らかな増幅産物の増加が確認され、*loxP* 配列検知系の一次スクリーニングの有効性を示すことができたが、確定判定には、さらなる検知系の開発が必要であることも明らかとなった。

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 准教授）

手島 玲子（国立医薬品食品衛生研究所・
代謝生化学部 部長）

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、胚性幹細胞（ES 細胞）などの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れ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（*loxP* 配列の検知）を構築することを目的に、モデル ES 細胞（*loxP* 配列を 1 コピー有する細胞）のクローニングとその確認、並びに実際の

*loxP*配列の検知にインバース PCR を実施した。

B. 研究方法と結果

1) Cre リコンビナーゼ導入 ES 細胞における GFP の発現解析

平成 22 年度において、モデル ES 細胞における Cre リコンビナーゼの発現を確認した。そこで発現した Cre リコンビナーゼの作用により、モデル ES 細胞のゲノムに挿入され、*loxP*配列に挟まれた GFP 遺伝子が削除され、GFP の発現（緑色蛍光）が消失するかどうかを解析した。Cre リコンビナーゼの発現は、抗 Cre リコンビナーゼ抗体を用いた免疫染色により、赤色蛍光で観察し、GFP の発現の有無を画像の統合 (merge) により分析した。その結果、図 2 に示したように、Cre 発現 ES 細胞において GFP の発現が消失している細胞が観察された（矢印）。この結果は、モデル ES 細胞から Cre リコンビナーゼの作用により、GFP の遺伝子が削除されたことを示唆している。

2) GFP 消失モデル ES 細胞のクローニング

1) の結果から、ES 細胞のコロニー中に 1 コピーの *loxP*配列を持つ ES 細胞の存在が示唆されたことから、次に限界希釈法によるこの ES 細胞のクローニングを試みた。この ES 細胞のクローニングには、本協力研究者である Horiuchi らのグループが考案したニワトリ ES 細胞のクローニング法 [Nakano, M. et al., *J. Poult. Sci.*, 48 (1): 64-72 (2011)] を利用した。その結果、エレクトロポレーション法により Cre リコンビナーゼ発現ベクターを導入して得られた 162 のクローンから 4 クローンの GFP を発現しない ES 細胞 (GFP⁻ ES 細胞) が得られた (図 3)。

3) GFP⁻ ES 細胞ゲノム中の *loxP*配列の確認

2) で得られた GFP⁻ ES 細胞を最終的に *loxP*配列検知のためのモデル細胞に利用するには、この GFP⁻ ES 細胞が Cre リコンビナーゼの作用により得られたことを明らかにしておく必要がある。即ち GFP⁻ ES 細胞中に 1 コピーの *loxP*配列の存在を証明しなければならない。そこで、ゲノム PCR による *loxP*配列の確認を行なった。もしも予想通り GFP⁻ ES 細胞のゲノム中に 1 コピーの *loxP*配列が存在するならば、オボムコイド遺伝子座の *SacI* 認識配列に挟まれた領域 (2, 172 bp) に *loxP*配

列が存在するはずである (図 4-1)。そこで図 4-1 に示したゲノム配列中に F1, F2 及び R1 のプライマーを設計し、F1-R1 並びに F2-R1 のプライマー対によるゲノム PCR を実施した。ゲノム PCR の鋳型には、組換えを行なっていない正常 (normal) ES 細胞、並びに 2) で得られた 4 種の GFP⁻ ES 細胞のうち 3 種の細胞から抽出したゲノム DNA を使用した。その結果、F1-R1 のプライマー対を用いた PCR では、normal ES 細胞のゲノム DNA を鋳型にした場合に野生型 (wild type) の増幅産物が、GFP⁻ ES 細胞のゲノム DNA を鋳型にした場合には、wild type の増幅産物に加えて *loxP*配列が加算されたと思われる増幅産物が得られることがわかった (図 4-2)。そこで次に *loxP*配列の存在を確定するために F2-R1 のプライマー対を用いた PCR を実施した。F2 プライマーは *loxP*配列の一部であり、GFP⁻ ES 細胞のゲノム中に *loxP*配列が存在するときのみ約 200 bp の増幅産物が得られることになる。PCR の結果、図 4-3 に示したように使用した 3 種の GFP⁻ ES 細胞のゲノム DNA を鋳型にした場合に、陽性対象として使用したベクターと同じ約 200 bp の位置に増幅産物が確認された。これらの結果は、クローン化した GFP⁻ ES 細胞のゲノム中に 1 コピーの *loxP*配列が存在することを示している。

4) インバース PCR による細胞中の *loxP*配列の検出

平成 22 年度の成果では、モデルベクターを鋳型にしたインバース PCR により、*loxP*配列の検出が可能であった。しかし、実際の組換え体検出の現場では、細胞中の雑多なゲノム DNA の中から特異的に *loxP*配列の検出を行なうことが必要である。そこで、3) で得られた GFP⁻ ES 細胞のゲノム DNA を鋳型に用いてインバース PCR による *loxP*配列の検出を試みた。

まず GFP⁻ ES 細胞から得られたゲノム DNA を *SacI* で処理し、セルフライゲーションを行なうことにより、インバース PCR の鋳型となる環状 DNA の作出を行なった。*loxP*配列をもつ環状 DNA の作出は、図 5-1 に示した位置にプライマー対を設計し、環状 DNA が育成された時にのみ 465 bp の増幅産物が PCR により得られることで確認した。その結果、図 5-2 に示したように normal ES 細胞及

び GFP⁺ ES 細胞のゲノム DNA から目的の増幅産物が得られ、インバース PCR の鋳型となる環状 DNA の作出を確認した。

次にインバース PCR 用のプライマーを図 6-1 に示したように 7 種を設計し、作出した環状 DNA を鋳型にしたインバース PCR を実施した。その結果、図 6-2 に示したように、normal ES 細胞を鋳型にした場合に比べ、GFP⁺ ES 細胞を鋳型にした場合において増幅が予想される約 2 kbp の位置にスメアーながら明らかに強い増幅産物の増加が認められた。

(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。そのため、これらの高度化した遺伝子組換え体の検知系を構築しておくことは、我国の食の安全を確保していく上で重要な研究課題でもある。本研究では、その検知系のひとつのモデルケースとして、Cre-loxP のシステムにより作出された組換え体の検出系の構築を試みた。Cre-loxP システムの場合、外来遺伝子として組込まれた薬剤耐性遺伝子などは、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。そこで本研究では、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 23 年度には実際に *loxP* 配列のみを有するモデル ES 細胞を作出し、平成 22 年度にベクター系で試行し検知に成功したインバース PCR の適応を計った。その結果、モデル ES 細胞株の樹立、インバース PCR 用の環状鋳型 DNA の作出まで計画通り順調に研究が進捗し、インバース PCR により wild type と *loxP* 挿入ゲノムでの増幅のされかたの違いを明らかにすることができた。しかし、最終的な正確な組換え体の検知系にするには、課題も明らかになった。それは、インバース PCR で *loxP* 配列を標的に増幅を行なった場合に特異的な増幅産物が得られない点である。図 6-2 に示したように、組換え体 (GFP⁺ ES 細胞) と非組換え体 (normal ES 細胞) で増幅産物の増幅のされ方で差異が認められたものの、本実験のようにモデルケース (ゲノム上で組換え位置の情報がある場合) では判別が可能であっても、情報がない組換え体の場合、本検出系では非特異的な増幅なのか特異的な増幅なのか判別できないと思われる。特に本実験のように、増幅産物の電気泳動がスメアーで得られると、塩基配列の解析による判別も困難である。その原因は、インバース PCR では *loxP* 配列中に対となるプライマーを設計する必要があるが、34 bp の *loxP* 配列のうち 5' 側の 14 塩基と 3' 側の 14 塩基はパリンドロームであり、インバース PCR 用のプライマー設計が極めて困難であるためである。また設計したプライマーの T_m 値はいずれも低い値であり、これも PCR の特異的な増幅を阻害していることが容易に想像される。

今後の展望として、本研究で確立したインバース PCR による Cre-loxP のシステムにより作出された組換え体の検知系を第一次スクリーニングとして、第二次スクリーニング (確定判定) にアダプター法などのさらに精度を高めた検知系を取り入れ、組合せることで、高度化した遺伝子組換え体の検知系に適応できるのではないかとと思われる。

近年、Cre-loxP のシステム以外にも Zinc Finger Nuclease を利用したゲノム編集技術による組換え体作出も数多く報告されており、これらの対応も必要であると思われる。

D. 結論

平成 23 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 が一次スクリーニングにおいて有効なことを明らかにした。今後は、確定判定に必要な二次スクリーニングの開発が必要である。

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 鶏の研究 (木香書房・隔月連載)

⑦遺伝子組換え鶏の作出方法 3, 鶏の研究 (6 月号) (2011).

⑧遺伝子組換え鶏の作出方法 4, 鶏の研究 (8 月号) (2011).

⑨鶏 LIF の発見物語 1, 鶏の研究 (10 月号) (2011).

⑩鶏 LIF の発見物語 1, 鶏の研究 (12 月号) (2011).

⑪遺鶏 LIF を用いた遺伝子組換え鶏の作出技術, 鶏の研究 (2 月号) (2012).

⑫遺伝子組換え鶏が切り開く未来, 鶏の研究 (4 月号) (2012).

2) Fukushima, Y., Miyai, T., Kumagae, M., Horiuchi, H. and Furusawa, S. Molecular cloning of chicken interleukin-5 receptor α -chain and analysis of its binding specificity. *Dev. Comp. Immunol.* (2012) in press.

2. 学会発表

1) 中野幹治, 船戸興自, 江崎僚, 西本真樹, 松田治男, 古澤修一, 堀内浩幸. 「実用化に向けた遺伝子組換えニワトリ ES 細胞の解析」第 34 回日本分子生物学会年会, 平成 23 年 12 月 13-16 日パシフィコ横浜 (横浜市).

2) 船戸興自, 中野幹治, 松田治男, 都築政起, 古澤修一, 堀内浩幸. 「ウズラ ES 様細胞の性状解析」第 34 回日本分子生物学会年会, 平成 23 年 12 月 13-16 日パシフィコ横浜 (横浜市).

3) Ezaki, R., Horiuchi, H., Nakano, M., Nouno, A., Matsuda, H. and Furusawa, S. Development of low-allergen eggs by genetically-modified technology of chickens. 第 34 回日本分子生物学会年会, 平成 23 年 12 月 13-16 日パシフィコ横浜 (横浜市).

4) Nakano, M., Nishimoto, M., Ezaki, R., Furusawa, S. and Horiuchi, H. Requirement for chicken embryonic stem cells to achieve genetically modified chickens. The International Society for Transgenic Technologies, 10th Transgenic Technology (TT) meeting, Florida (USA), October 24-26 (2011).

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

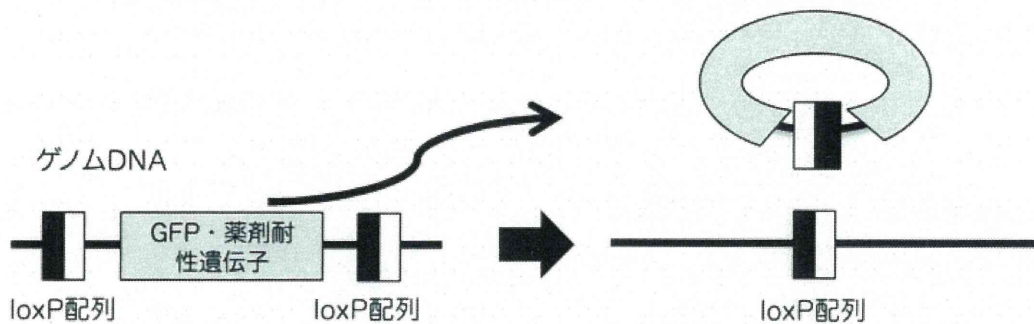


図1 Cre-loxPシステムの原理



図2 Creリコンビナーゼ導入ES細胞におけるGFPの発現解析

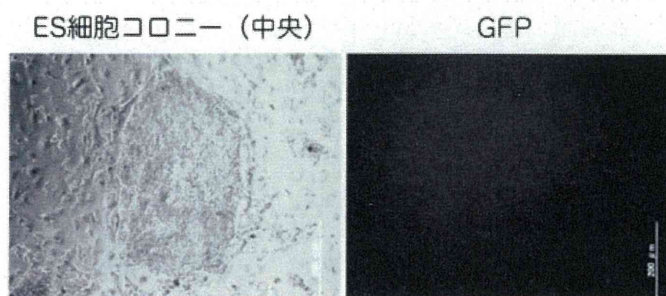


図3 GFP-ES細胞のクローニング

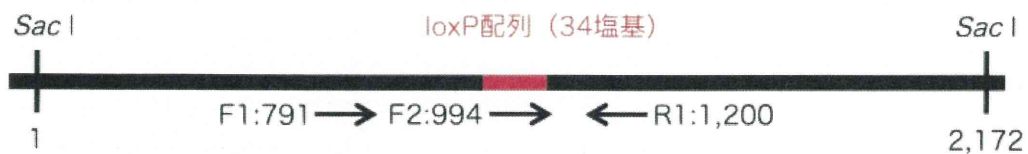


図4-1 標的遺伝子座とプライマーの位置



図4-2 F1-R1プライマーによるPCR

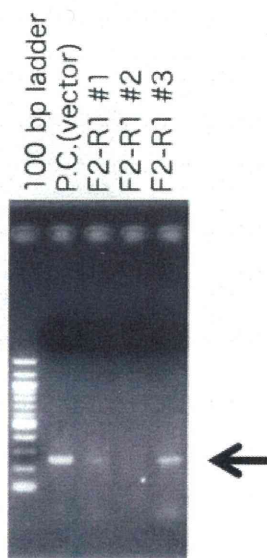


図4-3 F2-R1プライマーによるPCR