

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
総合研究報告書（平成21～23年度：分担）

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 客員研究員

研究要旨：2009年1月にFDAは「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」について産業界向けガイダンスを公表した。その内容は今まで動物医薬品として取り扱っていた遺伝子組換え魚類を食品として取り扱うとする記述があることから、遺伝子組換え魚類の食用として利用についても対応を取ることを明らかにした。FDAは申請中の案件については途中経過を公表しない、とした。一方、申請を提出したAquaBounty Technologies社はホームページ上でFDAから請求された研究資料は全て提出し、許可がおりるのを待っている状態であることを公表した。同社は許可がおり次第、商業規模での試験養殖をする計画を立てていることも公表した。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。2009年に公表された遺伝子組換え魚に関する論文はサケ科魚類やコイを用いた報告以外に前年に引き続き、微細藻類に牛由来のラクトフェリン遺伝子を導入し、この遺伝子組換え微細藻類を餌として与えたあと、攻撃試験を行って耐病性が付与されたことを確認した、といった新しい取組みの論文が報告された。中国で行われた遺伝子組換えコイを用いた報告もされているが、中国における遺伝子組換え魚の制度上の進捗状況に関する情報は見つけられなかった。また、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 Technologie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年から2011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

遺伝子組換え大西洋サケを90年代から食品として出荷することができるようにアメリカ・カナダに本拠を置くA/F Protein社の関連会社 AquaBoun

ty Technologies社 (<http://www.aquabounty.com/>)がFDAに申請中であった。FDAは遺伝子組換え動物を医薬品の一種として取り扱い、食品として遺伝子組換え魚類を扱うことはなかったが、2008年9月に遺伝子組換え動物を食品として扱う規制の指針案を公表し、一般からの意見を募るため、パブリックコメントを求める発表を行い、翌年1月に正式なガイダンスを発表した。この中で、食用を目的とした遺伝子組換え魚類についての記述のあることから、AquBounty Technologies社が申請している遺伝子組換え大西洋サケについても食品として検討することになったと思われる。同社ホームページ上の11月22日付けのプレスリリース画面上ではFDAが要求する研究資料は全て提出したこと、2010年中には許可がおりることを予想していること、商業規模で野外試験を行うため遺伝子組換え大西洋サケの受精卵を提供する準備をしていること、などが報告されている。同社のホームページ上の情報では販売を計画している遺伝子組換え大西洋サケは全雌3倍体（XXX型）にして販売すること、不凍化タンパクは産生していないこと、成長ホルモンも野生種と比べてレベルが増加することはないことを報告している。しかし、中国の遺伝子組換えコイを用いた研究では血清中の成長ホルモン量は野生種が季節変化があるのに対し、成長ホルモン遺伝子を導入したコイでは季節変化が無く、その量は野生種に比べ54倍から256倍高かったことが報告されている。

遺伝子組換え大西洋サケに関する論文では成長促進作用の確認、代謝や遊泳能力を比較して、酸素吸収量は野生種と比べ1.7倍高いこと、遊泳能力は大差がないこと、摂餌行動は野生種に比べ活発であるが、捕食者が存在する場合にも摂餌行動を取ることから捕食される可能性が高いことなどが報告されている。また、野生種の2倍体と3倍体の遊泳力を比較し、有意差がなかったことも報告されている。導入した遺伝子について調べた結果、組織特異的発現はなかったことなどが報告されている。これらの文献については資料として、その要旨を添付する。

前年に引き続き、台湾の研究者が微細藻類に牛由来のファクトフェリン遺伝子を導入した遺伝子組換え微細藻類を作出し、これを餌として食べられたメダカを用いて病原菌で攻撃試験を行い、耐

病性が付与されたことを確認した報告を出した。

2010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. AquAdvantage 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 α 系列の α 遺伝子座に安定に取り込まれた α 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、AquAdvantage 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

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

微細藻類に遺伝子を導入して、その遺伝子導入微細藻類を餌として動物プランクトンを培養し、それを餌として魚類を飼育することによって、結果的に魚類に遺伝子を導入しなくても目的の形質を付与することが可能である、という論文は注目してよい研究である。ただし、遺伝子導入微細藻類の環境への拡散が懸念されることから今後の給餌方法等の情報が望まれる。

遺伝子組換え大西洋サケの代謝や遊泳能力、2倍体と3倍体の比較をした結果の論文では成長や酸素吸収量などで組換え魚が優位に高かった報告があるが、捕食者が存在しても摂餌行動を取ることから捕食者に捕まる可能性も高いことを考えると、これらの遺伝子組換え大西洋サケが自然界に逃避した場合に特に優位な生態的位置を占めるとは考えにくい。

全て生産する個体は3倍体であることをホームページ上で述べているが、全ての個体をチェックすることをしなければ現在の技術で2倍体が混在していないことを証明することは難しい。実際に養殖された場合には、これらのチェック体制も必要であると思われる。

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っていることである。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貪欲さのため、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。

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

米国において、遺伝子組換え動物を正式に食品として申請することができる指針が整備され、審査中である。途中経過が公表されないことから、申請会社である AquaBounty Technologies 社のホームページに今後とも注意していく必要がある。

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。

新しい遺伝子組換え魚の論文は 2011 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)
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. A/F Protein 社が所属する会社
http://www.genesis.mun.ca/
http://www.genesis.mun.ca/research/index.php?includefile=includes/af_protein.html§ion=A/F%20Protein%20-%20Purified%20Gene%20and%20Growth%20Hormone
4. 組換え魚に反対している消費者団体
The center for food safety ; ge-fish.org

組換え体に関する特許情報

5. Isolation and Characterization of an Actin Gene from Abalone
U.S. Patent Number 5,675,061
Powers *et al.* Oct. 7, 1997
6. Lycopene Cyclase Gene
U.S. Patent Number 5,792,903
Hirschberg *et al.* August 11, 1998
7. Transgenic Salmonid Fish Expressing Exogenous Salmonid Growth Hormone
U.S. Patent Number 5,545,808
Hew *et al.* August 13, 1996
8. Transgenic Fish and Vectors Therefor...
U.S. Patent Number 5,998,697
Devlin, Robert H. Dec. 7, 1999
9. Transgenic fish and a method of harvesting islet cells therefrom
U.S. Patent 6,015,713
Wright Jr. *et al.* Jan. 18, 2000
10. Cell-lineage specific expression in transgenic Zebrafish
U.S. Patent Number 6,380,458
Lin Shuo June 9, 1997
11. Expression vector of a mud loach growth hormone gene

- U.S. Patent Number 6,372,959
Kim, et al
April 16, 2002
12. Transgenic tilapia comprising a humanized insulin gene
U.S. Patent Number 6,476,290
Wright, Jr., et al
13. 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
www.fda.gov/NewsEvents/PublicHealthFocus/ucm224089.htm の中の、
14. 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)
15. 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)

参考文献 (2009 年以降に報告された主な論文)

16. Devlin, R. H., Sakhrani, D., Tymchuk, W. E., Rise, M. L. and Goh, B., 2009. Domestication and growth hormone transgenesis cause similar changes in gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). PNAS, 106(9), 3047-3052.
17. Duan, M., Zhang, T., Hu, W., Sundstroem, L. F., Wang, Y., Li, Z., Zhu, Z., 2009. Elevated ability to compete for limited food resources by 'all-fish' growth hormone transgenic common carp *Cyprinus carpio*. J. Fish Biol., 75(6), 1459-1472.
18. Dunham, R. A., 2009. Transgenic fish resistant to infectious diseases, their risk and prevention of escape into the environment and future candidate genes for disease transgene manipulation. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 32, 139-161.
19. Higgs, D. A., Sutton, J. N., Kim, H., Oakes, J. D., Smith, J., Biagi, C., Rowshandeli, M. and Devlin, R. H., 2009. Influence of dietary concentrations of protein, lipid and carbohydrate on growth, protein and energy utilization, body composition, and plasma titres of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in non-transgenic and growth hormone transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). Aquaculture, 127-137.
20. Le Curieux-Belfond, O., Vandelac, L., Caron, J. and Séralini, G.-É., 2009. Factors to consider before production and commercialization of aquatic genetically modified organisms: the case of transgenic salmon. Environ. Sci. Policy, 12, 170-189.
21. Leggatt, R. A., Raven, P. A., Mommsen, T. P., Sakhrani, D., Higgs, D., Devlin, R. H., 2009. Growth hormone transgenesis influences

- carbohydrate, lipid and protein metabolism capacity for energy production in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 154(1), 121-133.
22. Li, D., Hu, W., Wang, Y., Zhu, Z. and Fu, C., 2009. Reduced swimming abilities in fast-growing transgenic common carp *Cyprinus carpio* associated with their morphological variations. *J. Fish Biol.*, 74, 186-197.
 23. 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 Shellfish Immunol.*, 26, 316-325.
 24. Novoa, B., Bowman, T. V., Zon, L. and Figueras, A., 2009. LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.*, 26, 326-331.
 25. Rehbein, H. W., Devlin, R. H., 2009. No evidence for enhanced parvalbumin concentration in light muscle of transgenic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Eur. Food Res. Technol.* 229(4), 579-584.
 26. Tymchuk, W. E., Beckman, B. and Devlin, R. H., 2009. Altered expression of growth hormone/insulin-like growth factor I axis hormones in domesticated fish. *Endocrinology*, 150(4), 1809-1816.
 26. Tymchuk, W., Sakhrani, D., Devlin, R., 2009. Domestication causes large-scale effects on gene expression in rainbow trout: Analysis of muscle, liver and brain transcriptomes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 164(2-3), S., 175-183.
 27. Zhong, S., Wang, Y. -P., Pei, D. -S., Luo, D. -J., Liao, L. -J., Zhu, Z. -Y., 2009. A one-year investigation of the relationship between serum GH levels and the growth of F-4 transgenic and non-transgenic common carp *Cyprinus carpio*. *J. Fish Biol.*, 75(5), 1092-1100.
 28. Fletcher *et al.* (2011). Lysozyme transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research* 42, 427-440.
 29. 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.
 30. 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.
 31. Xi *et al.* (2011) Enhanced hyperplasia in muscles of transgenic zebrafish expressing Follistatin 1. *Sci. China Life Sci.* 54(2), 159-165.
 32. Duan *et al.* (2011) Behavioral alterations in GH transgenic common carp may explain enhanced competitive feeding ability. *Aquaculture* 317, 175-181.
 33. Li *et al.* (2011) The hematological response to exhaustive in 'all-fish' growth hormone transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 311, 263-268.
 34. 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.
 35. 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.
 36. Yu *et al.* (2011) Rapid growth and sterility of growth hormone gene transgenic triploid carp. *Chinese Sci. Bull.* 56, 1679-1684.
 37. 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.
 38. 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.
 39. Behavioral alterations in GH transgenic common carp may explain enhanced competitive feeding ability. *Aquaculture* 317, 175-181.
 40. 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.
 41. 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.
 42. Moreau *et al.* (2011) Reproductive performance of alternative male phenotypes of growth hormone transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Evol. Appl.* 4, 736-748.
 43. Fitzpatrick *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.
 44. 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.

遺伝子組換え大西洋サケに関する論文

45. 全て魚類由来の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 ; S. J. Du, Z. Gong, G. L. Fletcher, M. A. S., M. J., King, D. R. I, C. L. Hew, *Bio/Technology* 10, 176-181 (1992)

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微量注入し、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。

46. 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 ; E.D. Stevens, A. Sutelin, T. Cook, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 2028-2035(1998)

本論文では、成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケの酸素吸収量は、同程度の大きさを有する対照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導入大西洋サケはまた、酸素吸収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°C で生育した成長ホルモン遺伝子組換え大西洋サケ *Salmo salar* 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、対照サケと比較して 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対照大西洋サケの両方とも、酸素吸収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吸収量は一日のどの時点においても対照サケの 1.7 倍に達した。10mg/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吸収量に関係は見られなかった。すなわち、臨界酸素吸収水準は遺伝子組換え大西洋サケでは 6mg/L であり、対照大西洋サケでは 4mg/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対照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吸収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、対照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。

47. 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 ; R. L. Saunders, G. L. Fletcher, C. L. Hew, *Aquaculture* 168, 177-193 (1998)

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 (*Oncorhynchus tshawytscha*) の成長ホルモン遺伝子より構成される遺伝子構築体を用いて作出した成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケ (*Salmo salar*) 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、1996 年 1 月に孵化し 2 月には摂餌活動を開始した。当初高水温 (16°C) 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 (16cm) に近づいた。通常の大西洋サケは 10cm に達していなかった。遺伝子組換え大西洋サケの大部分は 6 月に塩分濃度 3.5‰ の海水に直接放流後 96 時間以上生き延びた。一方、通常サケの生存時間は 24 時間を下回った。遺伝子組換え大西洋サケはエラの Na⁺/K⁺-ATP アーゼの作用水準が高く、6 月後半には低下に転じたが、これはスマルトの状態を示唆するものである。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 月に観測を中止するまでの間、死亡率も低水準であった。高温 (16°C) で飼育した場合、非遺伝子組換え大西洋サケにおいては Na⁺/K⁺-ATP アーゼの作用の発達あるいは高い水準での作用の維持が妨げられたが、遺伝子組換え大西洋サケにおいてはエラの ATP アーゼの作用水準はわずかに低くなるにとどまった。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の発育が阻害されたりスマルト後の発育や海水での生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導入大西洋サケの成長に差別的な温度・照光時間で非組換えサケを飼育した場合、正常なスマルト発達およびスマルト後の能力に阻害が生じると思われる。

48. 成長促進遺伝子導入大西洋サケの採食行動お

よび捕食者に対する行動 ; M. V. Abrahams, A. Suttelin, Anim. Behav. 58, 933-942 (1999)

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、成長ホルモン導入遺伝子を持ち後世に伝えるよう生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導入大西洋サケを使用し、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直接試験を実施した。大きさの合致する遺伝子組換え大西洋サケおよび対照大西洋サケに対し、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キシング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採食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対照大西洋サケと比べて採食速度がおおよそ5倍速く、また動く速度が対照大西洋サケと比べて約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採食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、対照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採食活動を続けた。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、採食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。成長速度を高めるために必要な遺伝子操作が進化的変化により実現可能であるならば、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。

49. 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 ; Hew, C., Poon, R., Xiong, F., Gauthier, S., Shears, M., King, M., Davies, P. And Fletcher G., Transgenic Res., 8(6), 405-414(1999)

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。主要肝臓型の不凍タンパク遺伝子(wf1AFP-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。

50. 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 ; E. D. Stevens, G. N. Wagner, A. Sutterlin, J. Fish Biol. 55, 517-526 (1999)

12~13°Cで生育した成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケ *Salmo salar* はF₂世代にあたり、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。組織の採取時、遺伝子組換えサケは対照サケと比較して1.6倍早く成長していた。遺伝子組換え大西洋サケには対照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)の両方について、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対照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。

51. 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 ; E. D. Stevens, A. Suttelin, Environ. Biol. Fishes 54, 405-411 (1999)

成長促進遺伝子導入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対照大西洋サケと比べて大きいことが挙げられる。成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケ *Salmo salar* 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F₂世代にあたる。エラ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の対照大西洋サケと比べて生育速度が2.1倍早く、また対照大西洋サケと比べて酸素吸収速度が約1.6倍早かった。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エラの表面積は対照大西洋サケと比べて約1.24倍であり、酸素吸収速度の1.6倍には及ばないことを示す。エラの呼吸面積が増加するのは、主に各エラの繊維が比較

的均一に増加するためである。

52. 食物欠乏が成長促進遺伝子導入大西洋サケ (*Salmo salar*) の酸素消費および身体形成に対し及ぼす影響 ; J. T. Cook, A. M. Suttelin, M. A. McNiven, *Aquaculture* 188, 47-63 (2000)

F₂ 世代成長促進遺伝子導入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、スマルト前の体重 8 g から 55 g まで間隔をおいて非組換え大西洋サケとの比較を行った。食物欠乏を経験した 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の減少も急速であった。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対照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対照大西洋サケと比べて、より急速に体のタンパク質、乾燥物、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異化された。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、成長促進遺伝子導入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。

53. 成長促進遺伝子導入大西洋サケ (*Salmo salar*) の成長速度、身体形成、食物の消化能力および転換能力 ; J. T. Cook, M. A. McNiven, G. F. Richardson, A. M. Sutterlin, *Aquaculture* 188, 15-32 (2000)

成長促進遺伝子導入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導入大西洋サケの成長速度、食物の消化能力、食物の転換能力、身体形成について、スマルト前の 8~55g の成長段階で間隔をおいて非組換え大西洋サケとの間で比較した。成長促進遺伝子導入大西洋サケは、研究対象とした体重間隔において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。当該体重間隔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、対照大西洋サケと

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%、対照大西洋サケではそれぞれ 90%、84% であった。しかし、総飼料転換効率については遺伝子組換え大西洋サケは対照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、乾燥物、灰分、脂質、エネルギーは対照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。

54. スマルト前の成長促進遺伝子導入大西洋サケ (*Salmo salar*) の代謝速度 ; J. T. Cook, M. A. McNiven, A. M. Sutterlin, *Aquaculture* 188, 33-45 (2000)

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、スマルト前の体重 8~55g の段階で間隔をおいて成長促進遺伝子導入大西洋サケの定常酸素消費速度を非組換えサケと比較した。食物摂取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、対照大西洋サケと比べて 1.54~1.70 倍に達した。しかし、最初食物摂取からスマルトサイズに達するまでの時間全体でみると、遺伝子組換え大西洋サケはスマルトサイズに達するまでに、非組換えの対照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。摂餌後状態 (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。スマ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、スマ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。

55. 二倍体および三倍体の遺伝子組換え大西洋サケ (*Salmo salar*) の血液学 ; A. T. Cogswell, T. J. Benfey, A. M. Sutterlin, *Fish Physiol. Biochem.* 24, 271-277 (2002)

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、二倍体および三倍体遺伝子導入大西洋サケおよび非組換え大西洋サケの赤血球の高さおよび長さ、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。いずれの遺伝子型についても、三倍体遺伝子導入大西洋サケ赤血球は二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、三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、二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、二倍体および三倍体遺伝子導入大西洋サケの赤血球は、非導入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観察により、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。

56. 二倍体および三倍体大西洋サケの耐久遊泳 ; S. P. Cotterell, C. S. Wardle, J. Fish Biol., 65(Supplement A), 55-68 (2004)

体長 33.0 ± 1.4 cm の二倍体 (平均 \pm s.e. 体長は記号 L_F で表す) および三倍体 (体長 35.3 ± 0.5 cm) の大西洋サケ *Salmo salar* の集団が、念入りに監視された直径 10 m の円形タンクの中で制御された速度で遊泳を強制された場合、魚が好気呼吸の能力限界で遊泳する最大持続的遊泳速度 (記号 U_{ms} , 200 分持続可能な速度) には有意な差は見られなかった。二倍体は 1 秒あたり体長の 2.99 倍の速度 (単位 $bl\ s^{-1}$) ($0.96\ m\ s^{-1}$) を持続し、三倍体は $2.91\ bl\ s^{-1}$ ($1.02\ m\ s^{-1}$) の速度を維持した。試験実施にあたり魚を選択する際には、タンクの半径に沿って回転するガントリーから映し出された動くパターンに沿って遊泳できることを基準としており、選択手順には倍数により有意な差があるとは認められなかった。有意な差は、継続的な遊泳速度における耐久時間で測った魚の嫌気能力の違いに見られた。実験の最中、魚による自発的な遊泳速度は高まり、魚群行動は改善された。タンクの曲がり方が魚の遊泳速度に与える影響について計算した (タンクの曲がり方の影響を取り除くことで、二倍体・三倍体いずれに対しても速度は 5.5% 増加した)。三倍体大西洋サケの養殖に関連して、耐久時間および速度の有する意味合いについて検討する。

57. スモルト後の成長ホルモン導入大西洋サケ *Salmo salar* における呼吸循環器系の変化および限

界 ; E. J. Deitch, G. L. Fletcher, L. H. Petersen, I. A. S. F. Costa, M. A. Shears, W. R. Driedzic, A. K. Gamperl, J. Exp. Biol. 209, 1310-1325 (2006)

近年、成長ホルモン遺伝子導入がどのように魚の生態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生育環境・生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も多い。本研究では成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケの呼吸循環器系の生態について包括的に調べるため、対照大西洋サケと共有のタンクで生育した (10°C で最大 9 ヶ月間) 大きさの合致する成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケ (*Salmo salar*) 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導入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

(M_{O_2}) はそれぞれ 21%、25% 高かった。しかし、最大 M_{O_2} には同時増加が見られず、その結果遺伝子導入大西洋サケの代謝範囲は 18%、臨界遊泳速度は 9% 減少した。遺伝子導入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エラ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エラ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、スモルト後 (成魚) に成長ホルモン遺伝子導入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。

58. 大西洋サケ (*Salmo salar*) においてゲンゲ (*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 ; R. S. Hobbs, G. L. Fletcher, *Transgenic Res.* 17, 33-45 (2008)

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体を使用し、2種類の遺伝子組換え大西洋サケの系統が作製された。その株のうち一つはプロモーターの 5'領域が除去された OP5a AFP 遺伝子を使用して生成され

(t-OP5a-AFP と称する)、別の株には 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作動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な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と比べてより顕著であることが明らかになった。成長ホルモン導入遺伝子導入体には脾臓組織にのみ、目に見える交雑帯が見られた。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交雑帯が見られ、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。成長ホルモン導入大西洋サケは非導入大西洋サケと比較して成長が大幅に速いため、この株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生成するには明らかに十分であった。一方、AFP 遺伝子導入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。

59. 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 ; T. M. Butler, G. L. Fletcher, *Theriogenology* 72, 62-71 (2009)

成長ホルモン (GH) 遺伝子導入大西洋サケの株を生成するためにゲンゲ (*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、成長速度は大幅に高まった。この大西洋サ

ケの株におけるゲノム組み込み成長ホルモン導入遺伝子 (EO-1 α) について研究した結果、2115bp プロモーターのうち最初の 1579bp 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融合し、それぞれ 21°C および 37°C 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。構築体の発現は 266bp 未満の細胞株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、プロモーター内に複数部位における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 1579bp 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の削除された 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。

AquaBounty Technologies 社ホームページから

AquAdvantage® Fish

アクア・バウンティは、従来の魚よりも早く成長するように遺伝子組換えしたサーモン、トラウト、ティラピアを開発している。遺伝子組換え大西洋サケは従来のサーモンよりも 2 倍の速度で市場サイズに成長させることができる。この進歩によって養殖業者に (成長サイクルを短縮することで) 納得のいく経済的な利益をもたらすとともに、内陸での作業の採算性が向上するため、海上の養殖場に対する必要性が減じる。遺伝子組換え大西洋サケはまた繁殖不能であり、サーモン養殖場から脱出する魚を取り扱う上で最近の主要な懸念となっている、養殖魚間または天然の魚との異種交配の危険が取り除かれる。上記の成長図が示すように、遺伝子組換え大西洋サケは成長が早く、標準的サーモンよりも早く成熟した大きさに達するが、より大きく育つことはない。成熟した遺伝子組換え大西洋サケは対応する従来のサーモンと見分けがつかない。

Our Technology

アクア・バウンティは生命科学を戦略とし、現在

流通している製品に多様なバイオテクノロジーを用いて、主要な養殖魚の健康と生産性を改善する可能性を持っている。それらの技術とは：

- ・ 遺伝子およびタンパク質同定と解析。
- ・ 遺伝子発現の調節
- ・ 受容体の同定と遮断技術、および
- ・ 遺伝子組換え

当社はまずサーモン、トラウト、エビを重点とした最も一般的な養殖魚における深刻な生産性の制約に対処した製品を開発している。アクアドヴァンテージ®フィッシュ事業は、魚の単一の特定分子を組換えて初期段階でのより早い成長をもたらす技術に基盤を置く。これによって生産サイクルが短縮され、生産効率が増すのである。遺伝子組換え大西洋サケの場合は、これらの利点により代替生産システムを使用することが可能となり、それによって従来の大西洋サケでは経済的でなかった環境や魚の健康に関する大幅な利点が生まれている。他の研究者たちは遺伝子組換えまたは遺伝子操作をした大西洋サケを生産してきた。他の調査員によって生産された他の遺伝子組換え大西洋サケについての研究や報告書は、用いる遺伝子構成、導入の部位、あるいは制御様式が異なるため、遺伝子組換え大西洋サケには適用できない。特に重要なことは、遺伝子組換え大西洋サケは明確に定義づけされた唯一無比の製品であるということである。徹底的に研究されてきており、またその特性も明確に確立されている。その性質や利点は、大西洋サケのゲノムの特定の安定した部位に導入された特定の遺伝子構成が安定して発現されるところに由来している。

よくある質問 (FAQ)

遺伝子組換え大西洋サケについての質問

Q. 遺伝子組換え大西洋サケは他のサーモンよりも相当大きく育つとのことですが、交配について優位性があり、食べ物や空間について天然のサーモンを負かすことができるのですか？

A. いいえ。遺伝子組換え大西洋サケは初期の成長段階で他のサーモンよりも早く成長しますが、大西洋サケよりも大きくなるわけではありません。雄のサーモンは大きさによって交配の優位性を獲得することはありません。事実、「早熟な幼魚」（長さはたった約 15.2cm）は海に出る前の各新世代の約 5 分の 1 で父親となります。養魚場から脱出したサーモンについての研究では、それらは天然の魚よりも大きいのが常ですが、天然のサーモンの 16% の頻度でしか交配に成功しないことがわかっています。養殖サーモンは他の飼育されている家畜やペットに餌を与えるのと同様の小粒のド

ライフフードで育てられています。もし逃げ出せば、新しい餌を探すのに通常は慣れていません。ブリティッシュ・コロンビアやアラスカで捕獲される、脱出した養殖魚の 85% 以上は腹に何も食物がない状態であり、かれら自身が捕食される危険にさらされているでしょう。

Q. パデュー大学の研究者たちが、野生サーモン群は相対的に数の少ない遺伝子組換え大西洋サケによって絶滅に追いやられると報告して懸念を提起しました。これらのサーモンが天然の魚との交配に成功した場合、その新しい遺伝子は野生の遺伝子プールに「脱出」し、天然のサーモン群を改変してしまうのではないのでしょうか？

A. パデュー大学の科学者で「トロイの遺伝子仮説」を提唱したミュアとハワードは遺伝子組換え大西洋サケを勉強していません。かれらは日本のメダカの行動に基づいた数学モデルを設計したのです。メダカは小さな淡水魚、56 日間で成熟し、死ぬまで毎日繁殖します。サーモンは 3 年、5 年、または 10 年もかけて成熟し、ほとんどは生涯で 1 度だけ子を産みます。さらにアクア・バウンティはすべての雌の遺伝子組換え大西洋サケの不妊魚のみを市場に出すように規定しています。不妊の魚は生殖不能ですから野生のサーモンに遺伝子が移行することはありません。さらなる予防措置として遺伝子組換え大西洋サケは、商業的なトラウト養殖に使用されるのと同様の物理的に密閉した施設で飼育されています。このように遺伝子組換え大西洋サケは生物学的にも物理的にも幾重にも拘束された状態で飼育されており、野生種の遺伝子の多様性にネガティブな影響を与えるあらゆる潜在的危険を緩和しています。

Q. 遺伝子組換え大西洋サケは本当に不妊だと確信できますか？

A. はい。不妊魚を生産する私たちのプロセスの有効性を確認する固有のテストがあります。市場に出す魚の出荷分毎にこれらのテストを施行し、製品が規格に合っていることを確かめています。

Q. 遺伝子組換え大西洋サケは不凍化タンパク質や過剰な量の成長ホルモンを産出しますか？

A. いいえ。遺伝子組換え大西洋サケは不凍化タンパク質を産出しません。促進剤として不凍化タンパク質遺伝子から分子の「スイッチ」が用いられているだけです。遺伝子組換え大西洋サケは野生種の大西洋サケとまったく同じ成長ホルモンを産出し、野生種サーモンと比較してこのタンパクのレベルが増加することはありません。

遺伝子組換え魚の連邦規定に関する質問

Q. 人間の食用に飼育されている遺伝子組換え魚などの海の生物に関する規定を治める連邦法はあるのでしょうか？

A. はい。遺伝子組換え大西洋サケは食品医薬品化粧品法のもとに動物用医薬品センターによって管轄されています。遡ること1986年、米食品医薬品局（FDA）は、遺伝子操作や発現タンパク質は動物用医薬品製剤の治療に類似して受容する動物の「構造と機能」に影響を与えるという根拠で、遺伝子操作された動物と魚を管轄下に置くことと明示しました。FDAの管轄権は連邦裁判所によって支持されてきました。

Q. 1986年の合衆国「調和的枠組」は、バイオテクノロジーを規制から除外しようとするレーガン政権の政治的戦略ではなかったのですか？

A. いいえそうではありません。「調和的枠組」（51 連邦規定 23303）は従来の規制権限の範囲内で先進的バイオテクノロジーによって生産された製品を除外するのではなく包含する、確固とした法令上の権限の対象範囲を明示しました。個々の製品が開発された過程ではなく、個々の製品自体がリスクと利益の根源であり、規制措置の焦点であることを認識して、「調和的枠組」はFDA、環境保護庁、農務省の既存の権限を明確にし、食品医薬品化粧品法（FDA）、連邦殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法および有害物質規制法（EPA）、植物害虫防疫、植物検疫、ウィルス血清毒素法（USDA）によって定められた権限のもとに、バイオテクノロジーで生産された植物と動物を規制することになりました。「調和的枠組」の製品重視を支える科学的根拠は1989年、2000年、2002年に全米科学アカデミーが行った3回の個別調査によって裏付けられました。「調和的枠組」を支える規制上の根拠は1999年から2000年にかけてクリントン政権によって調査、評価、承認されました。

Q. FDAは遺伝子組換え魚の環境への影響を評価しますか？ またはFDAは遺伝子操作の過程で用いられる分子特性、薬学上の効果、または何らかの化学薬品の影響を評価することを制限していますか？ また環境リスク評価は生態系への潜在的な影響にまで及んでいますか？

A. FDAにおける環境リスク評価は、国家環境政策法（NEPA）および環境問題諮問委員会（CEQ）（40 CFR Parts 1500 から 1508）およびFDA（21 CFR Part 25）によって採択されたNEPAを施行する規定によって統制されています。当機関に課せられたNEPAおよびCEQの義務は、環境リスク評

価の対象範囲を含めて、連邦政府全体にわたるあらゆる機関に要請されている義務と完全に同一です。新医薬品適用への対応も必要な環境リスク評価の対象範囲にある当機関の位置は1998年の指針に詳述されています：「FDAは環境への害は、環境中の生命体への害毒だけでなく、害毒以外の環境への影響、例えば生態系のダイナミクスへの持続的な影響も含むと見なす。」

Q. FDAは遺伝子組換え魚の環境リスクを評価できるバイオロジー、エコロジー、環境科学の水産分野の専門家を有していますか？

A. FDAスタッフはバイオロジー、環境科学、リスク評価の分野で教育を積み、多数の環境影響評価を実施してきた専門家を有しています。各評価は、当局が承認した医薬品および食品添加物はこれらの生産、使用、廃棄の後で最終的に水界生態系に溜まるという明確な仮定に基づいてなされています。NEPAおよびCEQは連邦各機関に、機関の活動が環境に与える影響評価において、他の影響のある諸機関と連携するように要請しています。

Q. 科学に立脚したリスク評価はバイオテクノロジーの環境への影響評価に適切ですか？

A. 科学に立脚したリスク評価は潜在的なハザードを同定し、起こり得るそれらのハザードの蓋然性を数値化し、有意の安全閾値について不確実性を明らかにします。閾値は通常、リスクが起こり得るレベルの1000倍に設定されています。この手法は完全に予防措置に適用するものです。クリントン政権の前商務省次官であったデヴィッド・アーロンによれば、この科学に立脚したプロセスは「米国で開発・使用されているバイテクによる食物は『自然界の』対応物の安全性リスク以上のリスクを示すことはなく、いかなる疾患もバイテクによる食物に由来するものはなかったことを我々に示してきた。」同様に、環境への脅威—オオカバマダラの影響から先進ハイブリッドのスーパーウィードへの使用が増えている殺虫剤にいたるまでも、適切な研究によってすべて反証されるか、あるいは適切な農業実践や規制基準によって避けられてきました。1992年の「環境と開発に関するリオ宣言」で採択された「予防原則」では、「取り返しがつかないほど深刻な損害の脅威が」「完全な科学的確実性」を欠く場合には、「環境劣化を防ぐために費用対効果のある手段」のみを要請しています。米国の危機管理実践はこのテストの基準を満たしています。

同社ホームページ Press Releases から

25 November 2009
Aqua Bounty Technologies, Inc. (“Aqua Bounty” or
“the Company”)
Operations Update

今年9月の中間決算では、当社は、AquAdvantage®サーモン（AAS）に対するFDAのアプリケーションのすべての残りの研究の提出を完了したこと、FDAに今年の年末までに、その内部のレビューを完了することを期待していることを報告した。かなり進展はあるが、このプロセスは来年に延長する可能性が高い。経営陣は承認が遅れているのは製品の高い新規性によるもので、規制の困難さが出現したものではないことを理解している。当社は、このプロセスは、今後数ヵ月以内に完了し、それから商業化を完了することができると確信している。FDAの承認がおり次第、野外試験を行う最初の商業規模の生産者にAASの卵サンプルを提供するという計画が進行中である。これは2010年の産卵シーズンからの大規模な卵の生産によって2011年第1四半期につながっていくだろう。これとは別に、商業的市場化テストのためのAASを生産するプロジェクトが2010年の3月から5月の間にAASが市場サイズに達する時に販売に向けて最初のAASが飼育され準備する計画において進行中である。

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

総合研究報告書（平成21～23年度：分担）

遺伝子組換え動物の安全性評価に関する研究

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：近年、高度化が進む遺伝子組換え動物の作出技術に対応するために、組換え体の検知技術の開発に取り組んだ。特に多能性幹細胞を活用した遺伝子組換え動物において、Cre-loxP システムの導入により外来遺伝子が *loxP* 配列以外残存しないことが想定され、本研究ではニワトリ胚性幹細胞（ES）細胞をモデルケースとして、細胞に残存する *loxP* 配列の検知技術の開発を行った。平成21年度は *loxP*-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*）-*loxP* のカセットを持った pFlox-EIP ベクターの開発とその機能試験、並びにこのベクターを導入したモデル ES 細胞の樹立を完了させた。平成22年度は、pFlox-EIP ベクターを用いていくつかの *loxP* 配列の検知系を試行し、インバース PCR が有効であることを確認した。また Cre リコンビナーゼ発現ベクターを構築し、モデル ES 細胞での Cre リコンビナーゼの発現に成功した。平成23年度は、Cre リコンビナーゼ発現 ES 細胞から *loxP* 配列のみを有する ES 細胞をクローニングし、この細胞を用いて実際にインバース PCR を実施した。その結果、明らかな増幅産物の増加が確認され、インバース PCR が *loxP* 配列の一次スクリーニングに有効であることが明らかとなった。

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、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

一カー遺伝子は、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、平成 21~23 年度の三年間の検知系開発研究を行った。

B. 研究方法と結果

1. モデル遺伝子組換えベクターの構築

基本ベクターには、pCAG-IRES-EGFP を用い、このベクターから CAG プロモーター配列、EGFP 配列、IRES 配列、*Puro^r* の配列を取り出し、その 5' 末端と 3' 末端にニワトリのオボムコイド遺伝子座配列を付加したものを準備した (pEIP)。さらにニワトリのゲノム配列と CAG および *Puro^r* の間に *loxP* 配列を付加し、Cre リコンビナーゼの作用により、CAG から *Puro^r* までの配列が除去できるベクターを構築した (pFloxEIP)。

2. モデル遺伝子組換えベクターの機能試験

構築した pFloxEIP ベクターから、Cre リコンビナーゼの作用により標的配列が除去できることを確認するために、大腸菌より調整した pFloxEIP ベクターに直接 Cre リコンビナーゼを作用させた。対象には *loxP* 配列を付加していない pEIP と Cre リコンビナーゼに添付の *loxP* control DNA を用いた。500 ng の各ベクターに 5 U の Cre リコンビナーゼを添加し、37°C で 1 時間反応させた。配列除去の確認には、PCR を用いて行った。その結果、構築したベクターがモデル遺伝子組換えベクターとして機能することがわかった。

3. モデル ES 細胞の樹立

構築した pFloxEIP ベクターは、相同遺伝子組換えにより ES 細胞へ導入した。直鎖化した pFloxEIP をエレクトロポレーション法により ES 細胞へ導入し、ピュロマイシンを添加して ES 細胞の選抜を行った。選抜した ES 細胞は、EGFP の蛍光をもとに選抜の可否を判断し、また PCR を用いて相同遺伝子組換え細胞の有無をチェックした。相同遺伝子組換え細胞が確認された細胞集団は、限界希釈法による細胞クローニングを実施した。得られた細胞クローンは、最終的に PCR とサザンブロット法により相同遺伝子組換えの可否をチェックし、pFlox EIP が 1 コピー挿入されたモデル ES 細胞を樹立した。

4. モデル ES 細胞ゲノムを用いた標的遺伝子の除去

3 で樹立したモデル ES 細胞からゲノムを抽出し、Cre リコンビナーゼの作用により標的遺伝子の除去が可能かどうかを試験した。ES 細胞から抽出したゲノム DNA に Cre リコンビナーゼを作用させて 15, 30, 60 分後に PCR を行った場合、その反応時間の長さに依存して、PCR の増幅が強くなるということが確認され ES 細胞のゲノムに挿入された FloxEIP もまた、Cre リコンビナーゼにより標的遺伝子の除去が可能であることがわかった。

5. インバース PCR の有効性試験

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未知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。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の *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。その結果、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、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た。

6. ES 細胞における Cre リコンビナーゼの発現

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^r*) 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^r* 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。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。

7. Cre リコンビナーゼ導入 ES 細胞における GFP の発現解析

次に 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た *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、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。

8. GFP 消失モデル ES 細胞のクローニング

6 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。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。

9. GFP⁻ ES 細胞ゲノム中の *loxP* 配列の確認

GFP⁻ ES 細胞中に 1 コピーの *loxP* 配列が存在するかどうかをゲノム PCR により確認した。その結果、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、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がわかった。

10. インバース PCR による細胞中の *loxP* 配列の検出

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った。次に PCR による環状 DNA の確認を行い、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 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、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 の位置にスミ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が、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。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技術も数多く報告されており、今後はこれらへの対応も必要であると思われる。

D. 結論

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, 江崎僚, アレルギーフリーの卵開発は可能か, 養鶏の友 575: 29-31 (2010).
 - 2) 堀内浩幸, アレルギーフリーのたまご開発が可能か, 鶏の研究 (臨時増刊) 5: 5-7 (2010).
 - 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. Poult. Sci.*, 47 (2): 144-148 (2010).
 - 4) 堀内浩幸, 有澤謙二郎, ニワトリの万能細胞“ES細胞”とその遺伝子組換え, 化学と生物 48 (4): 237-242 (2010).
 - 5) 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)
 - 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).
 - 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).
 - 6) 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. Poult. Sci.*, 48 (1): 64-72 (2011).
 - 7) 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) Nakano, M., Fukushima, Y., Arisawa, K., Nishimoto, M., Yamashita, Y., Ezaki, R., Furusawa, S., Matsuda, H. and Horiuchi, H. Establishment of novel chicken embryonic stem cells capable of differentiating into germ cells. Developmental Biology 69th Annual Meeting, New Mexico (USA), August 5-9 (2010).
 - 2) 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).
 - 3) 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).
 - 4) 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).