

トランスジェニック魚類の育成

日本水産中央研究所 井上広滋

1. 初期のトランスジェニック魚類の研究

外来遺伝子を受精卵等に導入し組み込ませた動物、すなわちトランスジェニック動物はクローニングした遺伝子の機能や調節機構を生体内で研究するための有効な手段となるため、近年様々な動物において研究が進められている。とくにマウスにおいては遺伝子導入の手法は確立されたものとなり、分子生物学、発生生物学、医学などの分野の研究に貢献している。

魚類においては、外来遺伝子導入技術の研究は1980年代半ばに始まり、分子生物学の研究システムとしての利用をめざす基礎的な研究と、育種の手段としての利用をめざす応用的な研究の両面から研究が開始され¹⁾、卵母細胞へのマイクロインジェクション¹⁻⁴⁾、受精卵へのマイクロインジェクション⁴⁻⁷⁾やエレクトロポレーション^{4, 8)}などの遺伝子導入法が開発されてきた。

育種をめざす研究のほとんどは、1982年にPalmiterら⁹⁾により報告された外来成長ホルモン遺伝子の導入によりマウスの成長を促進したいわゆるスーパーマウスの実験を、サケ類などの有用な魚種においてトレースし、高成長品種を作出しようとする研究であった。しかし、初期の研究においては、研究の多くはマウスで用いられたプラスミドをそのまま魚類に導入したものがほとんどで、成長促進はおろか、外来遺伝子の発現を検出することすらできなかった。¹⁾

2. 魚類培養細胞における各種プロモーターの活性

魚類において外来遺伝子の発現させることに初めて成功したのはニワトリ δ -クリスタリン遺伝子をメダカに導入して発現パターンを調べた研究である¹⁻³⁾。この研究において、ニワトリの遺伝子の発現部位や発現時期は、メダカにおいてもニワトリにおける発現パターンと基本的には類似していたが、ニワトリにおける本来の発現を完全に再現することはできなかった。このことから、成長ホルモン遺伝子の導入実験において、遺伝子発現が認められなかったのは、用いた遺伝子、とくにプロモーターやエンハンサーなどの調節配列が、魚類以外の動物のものであったために正しく発現されないことが考えられた。そこで、他動物由来の調節配列の魚類における活性を調べる研究や、魚類のプロモーターやエンハンサーを単離しようとする研究が様々な研究機関で開始された。演者らはまず、魚類培養細胞RTL-4（ニジマス肝細胞由来）を用いて魚類において活性のあるプロモーターやエンハンサーの検索を行ない、哺乳類由来のSV40プロモーター

やマウスメタロチオネイン I (mMT-I) プロモーター、鳥類由来のラウス肉種ウイルス (RSV) プロモーター、キメラプロモーター miw (ニワトリβ-アクチンプロモーター+RSVプロモーター)、魚類由来のニジマスメタロチオネイン A (rtMT-A) プロモーターなどが、魚類細胞において発現活性を持つことを確認した。¹⁰⁻¹³⁾ これらのプロモーターのうち、SV40、RSV、miwは構成的に活性のあるプロモーターであるのに対し、mMT-I、rtMT-Aは金属による誘導に応答して発現した。

3. 魚類個体における各種プロモーターの活性

さらに、活性のあったプロモーターをレポーター遺伝子に連結してメダカ個体に導入し、魚類個体における各プロモーターの活性を調べたところ、SV40、RSV、miwは構成的に発現し¹³⁾、外来遺伝子を恒常的に発現させるために使用できることがわかった。また、mMT-IおよびrtMT-Aプロモーターは、平常は発現レベルは低い、飼育水に亜鉛を添加することにより発現レベルは顕著に増加し、飼育水への金属投与により発現をコントロールできることが明らかになった。¹²⁾ これらの誘導型プロモーターは発生に影響するような遺伝子を導入する場合に有効に用いられるものと思われる。また、rtMT-Aプロモーターについては、発現レベルが飼育水中の金属濃度に比例することが明らかとなり、発現レベルを調べることにより環境中の金属をモニターできる可能性が示唆されている。¹⁴⁾

4. 外来成長ホルモン遺伝子の発現

魚類個体において発現活性のあるプロモーターがわかったので、育種のためのモデル実験として、外来成長ホルモン遺伝子をニジマスに導入し、発現させることを試みた。¹⁵⁾ 導入した外来遺伝子はmiwプロモーターにニジマス成長ホルモンcDNAを結合したプラスミドpmiwGHで、マイクロインジェクション法によりニジマス受精卵に導入した。孵化した稚魚について逆転写PCR法による発現解析を行なったところ、外来遺伝子に由来する成長ホルモンmRNAの存在が確認された。さらに外来遺伝子導入群およびコントロール群の体重を給餌開始後から孵化149日後まで約30日毎に測定したところ、導入群の平均体重はコントロール群の112-126%となり、成長促進効果が認められた。この結果は、活性のあるプロモーターを用いることにより魚類においても外来遺伝子を発現させ、形質を改変することができることを示している。

以上のように、魚類における外来遺伝子導入実験に必要な情報は次第に整備されてきており、今後基礎・応用両面からの発展が期待される。

参考文献

- 1) Ozato, K., Inoue K. and Wakamatsu, Y. (1989) *Zool. Sci.* 6: 445-457.
- 2) Ozato, K., Kondoh, H., Inohara, H., Iwamatsu, T., Wakamatsu, Y. and Okada, T. S. (1986) *Cell Differ. Dev.* 19: 237-244.
- 3) Inoue, K., Ozato, K., Kondoh, H., Iwamatsu, T., Wakamatsu, Y., Fujita, T. and Okada, T. S. (1989) *Cell Differ. Dev.* 27: 57-68.
- 4) Ozato, K., Inoue, K. and Wakamatsu, Y. (1992) In: *Transgenic Fish* (Eds.) Hew, C. L. and Fletcher, G. L.) World Scientific Publishing, Singapore, pp. 27-43.
- 5) 井上広滋・尾里建二郎 (1990) *メダカの生物学* (江上信雄・山上健次郎・嶋昭紘編) 東京大学出版会 pp. 296-309.
- 6) 井上広滋・尾里建二郎 (1991) *マリンバイオテクノロジー* (嵯峨直恒・松永是編) 裳華房 pp. 184-191.
- 7) 井上広滋・尾里建二郎 (1992) *新生化学実験講座* 14. 発生・分化・老化 (日本生化学会編) 東京化学同人 pp. 199-208.
- 8) Inoue, K., Yamashita, S., Hata, J., Kabeno, S., Asada, S., Nagahisa, E. and Fujita, T. (1990) *Cell. Differ. Dev.* 29: 123-128.
- 9) Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., Birnberg, N. C. and Evans, R. M. (1982) *Nature* 300: 611-615.
- 10) Inoue, K., Akita, N., Yamashita, S., Shiba, T. and Satake, M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173: 1311-1316.
- 11) Inoue, K., Yamashita, S., Akita, N., Mitsuboshi, T., Nagahisa, E., Shiba, T. and Fujita, T. (1991) *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 1511-1517.
- 12) Inoue, K., Akita, N., Shiba, T., Satake, M. and Yamashita, S. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 1108-1114.
- 13) Inoue, K. (1992) *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1: 266-270.
- 14) 豊原治彦・木下政人・坂口守彦・井上広滋・山下伸也・佐竹幹雄・若松佑子・尾里建二郎 (1992) 平成4年度日本水産学会春期大会講演要旨集 p225.
- 15) Inoue, K., Yamada, S. and Yamashita, S. (1993) *J. Mar. Biotechnol.* 1, in press.