

遺伝子導入による魚類体色の変換 — 黒色メダカの白化 —

京都大学農学部水産学科

木下政人

有用な植物や家畜では、何世紀もの間に巧妙な交配技術により、農業上有益な形質を導入し維持してきた。一方、魚類においては近年養殖業の発展に伴い、選抜育種という古典的な遺伝子操作による有用形質の選抜と維持が行われ始めた。しかし、この方法には目的とする形質以外のものが維持されたり、何よりも形質を固定するのに長期間を要するといった欠点がある。そこで、細胞に直接遺伝子を導入することによって短期間で有用形質のみを導入できるトランスジェニック法（遺伝子導入法）が注目されるようになった。最初に魚類へのトランスジェニックが行われてから10年近く経過しているが、残念ながら、未だ顕著な形質転換魚は得られておらず、トランスジェニック法の産業面での有効性が疑問視されはじめている。そこで、本研究ではメラニン凝集ホルモン（MCH）遺伝子を用いて、トランスジェニック法で当初期待されていた顕著な形質転換（この場合は体色の白化）が可能であることを示すとともに、ここで得られた結果をもとにトランスジェニック法における今後の課題について考察する。

1. MCHの構造と機能

今回用いたシロザケMCHの遺伝子DNA（gMCH）配列を示す。（図1）gMCHはイントロンを含まず、下垂体において転写される。まず、前駆体MCH（132アミノ酸）として翻訳された後、第112番目と第113番目のArg-ArgのC末端で切断され、17アミノ酸からなる成熟型のMCHとして血中に分泌される。このMCHは体表に存在する色素細胞に到達し、拡散したメラニン色素胞を凝集させる。その結果、魚の体色が白くなる。

2. 遺伝子導入ベクターの構築とメダカへの導入

ポリA付加シグナルを有するgMCHを強力な発現誘導活性を持つサイトメガロウイルスプロモーター（CMV）の下流に連結した環状ベクター（pCMV-MCH）を作成した。（図2）pCMV-MCH溶液を野性型純系メダカHN I-1の1細胞期の受精卵の細胞質にマイクロインジェクションした後、卵を26℃で培養した。

-73 TAATGTTGCAAATCCTGGAAGTCCAAACAGTATAAAAAGAGGAAGACAAACATCTCGGTCAGAAGAGAACGAG
TATA
 1 CTCGAAAAAATTACAACAACCTGCAACATCAACCTCAACGAAGATCCTCATTCTCCAAGATGAGACACTAT
 ← **cMCH 5' end** **XhoI** MetArgHisTyr
 73 GTCCTCTCCATCTCCTTTGCCGTGGCACTTTTCTTGGAGTGCTACACACCGTCCACGGCGATCTCCATTGGC
 ValLeuSerIleSerPheAlaValAlaLeuPheLeuGluCysTyrThrProSerThrAlaIleSerIleGly
 145 AAGATGGACGACGTCGCCTTGGAACAAGATACCCTCGACTCCCTACTGAGTGTAGAGGTGTCTGAAAAACAGC
 LysMetAspAspValAlaLeuGluGlnAspThrLeuAspSerLeuLeuSerValGluValSerGluAsnSer
 217 CCTGATTCAAGTCAGAGGCAGGAGCTCCAAGATTGTCTTGTGGCAGACTCTGGCCTGTGGATGAACCTGAAC
 ProAspSerValArgGlyArgSerSerLysIleValLeuLeuAlaAspSerGlyLeuTrpMetAsnLeuAsn
 289 AGAGGACTTCCTTTCTACAAGCTGAGAGCTGCAGCCGCCGGCCCTGACAGAGCCCTGACTCTGGACCGCAGA
 ArgGlyLeuProPheTyrLysLeuArgAlaAlaAlaAlaGlyProAspArgAlaLeuThrLeuAspArgArg
 361 GAGGCTGGCCAGGACCTAAGCCCCAGCATCTCCATCGTCAGGAGGGACACCATGAGGTGTATGGTGGGAAGG
 GluAlaGlyGlnAspLeuSerProSerIleSerIleValArgArg**AspThrMetArgCysMetValGlyArg**
MCH
 433 GTGTACCGACCCTGCTGGGAGGTGTAGAGTTGACCAATGAGAGCGTCTCGTCTCATCATCAATCTGCCAGCC
ValTyrArgProCysTrpGluVal***

図 1. シロザケメラニン凝集ホルモン遺伝子の塩基配列とそのアミノ酸配列

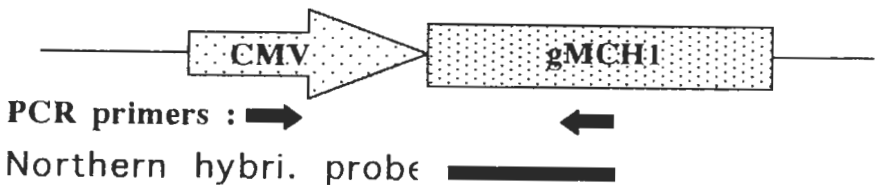
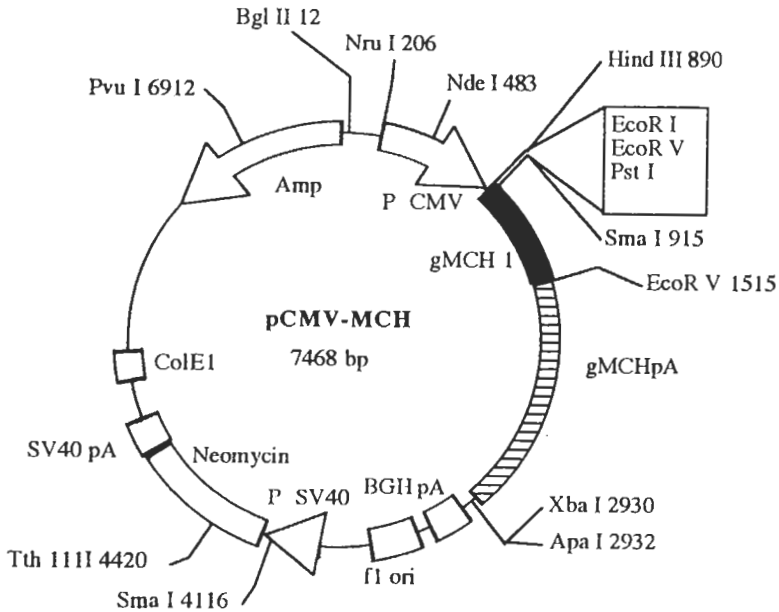


図 2. 遺伝子導入ベクターの構造

3. 体色白化メダカの獲得

マイクロインジェクションした100個の受精卵のうち、50個体が成魚にまで成長した。そのうち13個体にCMV-MCHの導入が確認された。(導入の確認はPCR法を用いた。プライマーは図2参照)しかしながら、体色の白化を示したのはわずかに2個体のみであった。(図3)

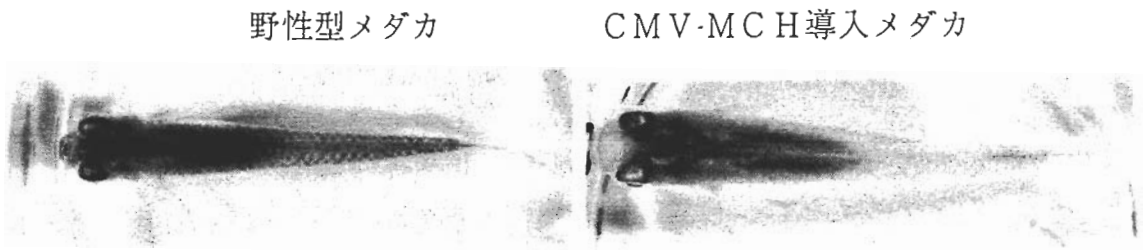


図3. CMV-MCH導入により白化したメダカ (F₀世代)

CMV-MCHの固定化を行うために、白化を示した個体と野性型メダカを交配しBC₁を得た。BC₁において、約20%の個体にCMV-MCHの存在が確認され、それら全てが白化を示した。

また、BC₁を用いて各部位ごとにノザンハイブリダイゼーション(プローブは図2参照)を行ったところ、頭部、えら、肝臓、体幹部および卵巣においてCMV-MCHの強い転写活性が認められたが、尾部と精巣では非常に弱かった。(図4)

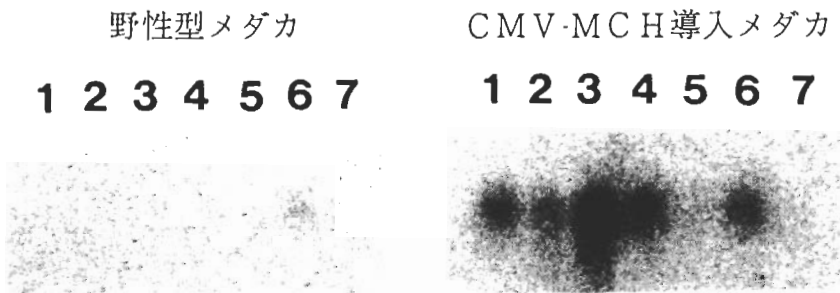


図4. 各部位における導入MCHの発現

- 1.頭部 2.えら 3.肝臓 4.体幹部(内臓を除く) 5.尾部 6.卵巣
7.精巣

以上のように、導入したCMV-MCHにより黒色メダカの体色を白化することができ、その形質は次世代に伝わった。つまり、トランスジェニック法を用いて、魚類に個体レベルでの顕著な形質転換を引き起こし、その形質を子孫に伝達・固定化することが可能であることが明らかとなった。

4. 今後の課題と問題点

今回の結果よりトランスジェニック法の有効性が明らかとなったが、同時にいくつかの問題点もクローズアップされた。すなわち、遺伝子が導入されているにもかかわらず、形質転換が見られない個体があった。また、今回発現制御に用いたプロモーターが組織特異的なものではないのに、部位により発現の程度が異った。これらの原因として、前者では遺伝子の導入部位やコピー数の関与が考えられ、後者では各組織による遺伝子発現機構の違いが関与していると考えられる。

トランスジェニック法を現実に応用可能な手法とするためには、導入遺伝子発現の時期、組織および発現量を制御する技術が確立されなければならない。そのためには、まず、魚類の遺伝子発現に関する基礎的な知見を蓄積する必要がある。この点において、今回作出したCMV-MCHメダカ系列は一つの良いモデルであると考えられるので、今後この系列の遺伝子解析を行う予定である。