

# エレクトロポレーション法に基づくトランスジェニック魚作出—作出魚の外来遺伝子の保有・発現—

近畿大学農学部水産学科

水産生物学研究室 上野 紘一

## 1. 魚類における外来DNA導入法

近年、魚類を受容体動物として外来DNA導入の研究が活発に行われるようになった。トランスジェニック技術を水産分野の研究に活用しようとする機運が高まってきたことによるが、研究材料としての魚類の有用性が再確認されたことにもよる。雌魚1個体から得られる卵数が多く、受精と胚発生が生体外で行われ、性的に成熟するまでの期間が短く、またコストが低いといった魚類のもつ特色は、この方面の研究に対して魅力的で、今後一層その利用度が高まると思われる。哺乳類への外来DNAの導入が、マイクロインジェクション法を始め、ウイルスベクター法、ES細胞法、精子ベクター法等のさまざまな手法によって行われてきたのに反し、魚類へのDNAの導入はほとんどマイクロインジェクション法に限られてきた。トランスジェニック魚に関する研究が活発化する中で、外来DNAをより効率よく導入するための技術の開発が必要となってきた。なぜなら、マイクロインジェクションは、導入DNAが全細胞に分配されるように第1卵割前に行われるが、この限られた時間内に多数の卵に遺伝子を注入することが難しいこと、特に強固な卵膜をもつ魚卵に対して必ずしも有効な方法とは言えず、その注入は次のような条件のもとで行われていること等による。

- 1) 卵膜が軟弱な卵母細胞に注入 (試験魚 メダカ)
- 2) 卵門から注入 (ニジマス、アトランティックサーモン、ティラピア)
- 3) 卵膜に予め空けた細孔から注入 (ニジマス、アトランティックサーモン)
- 4) ピンセットで卵膜を除去後注入 (ナマズ、ゼブラフィッシュ)
- 5) 酵素処理による卵膜除去卵へ注入 (キンギョ、ドジョウ)
- 6) 化学薬品により卵膜を軟化させて注入 (ニジマス)

マイクロインジェクションに替わるDNA導入法として2、3の試みがみられる。1つはエレクトロポレーションを伴って受精卵または精子にDNAを導入するものであり、他は外来DNAと精子を混合して短時間培養しDNAを精子に結合させるものである(表1)。精子に対する処理では、それらの精子による受精を通じてトランスジェニック魚が作出される。

## 2. 魚類に対する精子ベクター法の有効性

精子を介した遺伝子の導入(sperm-mediated gene transfer)は、マイクロインジェクション法のもつ弱点をカバーし、特にエレクトロポレーションに基づく導入では外来遺伝子が精子核中に取り込まれやすいと思われる。演者らは、トラ

ンスジェニック魚作出におけるこの技術の有効性を検討するため、淡水魚数種を用いて、エレクトロポレーションにより精子に外来遺伝子を導入、これらの精子で受精した卵の発生に伴う生残状況、仔稚魚における外来DNAの保有状態・遺伝子発現等につき調査した。またエレクトロポレーションにより受精卵に外来遺伝子を導入して同様の調査を行った。以下に各試験結果について述べる。

#### 1) 精子への遺伝子導入によるトランスジェニック魚作出

ニジマス、ホンモロコ、カワチブナを材料として、これらの希釈精液（搾出後、精漿のイオン組成を有するBSSで5倍希釈）200 $\mu$ lと E.coli  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子挿入プラスミド pmiwZの溶液(100 $\mu$ g/ml)200 $\mu$ l、またはホタルルシフェラーゼ遺伝子挿入プラスミド pGVC の溶液(100 $\mu$ g/ml)200 $\mu$ lを混合、ECM 600(BTX社)により1.0-2.0 kV、0.5-0.6 msec で3回パルスをかけた。処理精子による媒精は搾出直後の卵に対し直ちに行った。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は、X-galを含む反応液で検出した。またルシフェラーゼ活性は、ルシフェリン、MgCl<sub>2</sub>を含む反応液で検出、その発光を高感度フィルムにとらえた。

ニジマスにおいては、1.0-2.0 kVの全試験区に導入DNAを保有する個体がみいだされ、その出現率は試験電圧強度の間で明瞭な相違を示さなかった。ホンモロコとカワチブナにおいては、共に1.8 kV試験区にのみ導入DNAを保有する個体が認められた(表 2-4)。外来遺伝子の発現はカワチブナ胚(原腸胚期、胚体形成期)で調査したが、各試験区の個体を通じて発現をみなかった。処理精子による受精卵の孵化率は、ニジマスでは概して高く75.5-92.0%、カワチブナでは53.0-80.0%、ホンモロコでは処理電圧の強弱で変動し 34.0-91.0 の範囲に分布した(表 2-4)。なお、カワチブナ精子の観察から、エレクトロポレーション処理によって精子頭部の細胞膜に小孔、亀裂が生じること(図1)、その運動活性は電圧を高めると低下するものの、なお受精可能な運動時間を維持することが分かった(図2)。

#### 2) 受精卵への遺伝子導入によるトランスジェニック魚作出

カワチブナ受精卵を媒精後 7分から 6分間、20℃の0.25%トリプシン溶液中で処理し卵膜除去した。pmiwZ溶液(100 $\mu$ g/ml)200 $\mu$ lに卵膜除去卵約150個を投入、電圧 0.01-0.07kV で3回パルスを与えた。処理卵は Holtfreter液中で培養した。導入DNAを保有する個体は 0.01kV 試験区にはみいだせなかった。0.03 kV以上の電圧の試験区には 40-50%の個体に導入DNAが検出された(表 4)。外来遺伝子の発現は原腸胚期に調査し、0.07kV試験区の10%に当たる個体にモザイク様発現をみた。孵化期の生残率は 67.0-83.0%の範囲にあった。

以上の結果から、エレクトロポレーションにより精子を介して魚卵に外来DNAを導入できること、また、受精卵にも直接DNAを導入できることが明確になった。外来DNA検出個体の割合は、従来の報告(表1)に比べて同等か、あるいは著しく高かった。卵への導入は卵膜を除去することにより容易になること

が窺われる。今後、精子とDNAの混合割合、媒質溶液の組成を検討することによりその頻度をさらに高めることができると思われる。電ポレーションによるDNA導入は、卵よりも精子に対して行う方がより有効であると考えられる。精子に導入した場合、外来DNAが核中に取り込まれ易く、構造的損傷を受けても核の受け渡しができるれば問題ないからである。マイクロインジェクションのそれに比べ遺伝子発現が劣ることから、今後、通電によるプラスミド構造への影響等につき調査しなければならないが、いずれにしても電ポレーションによる外来DNA導入法は、トランスジェニック魚作出の有力な手法として重要な位置を占めてくるとと思われる。

表 1 魚類への電ポレーションによる遺伝子導入

| 精子への導入 (精子ベクター法) |                |                   |              |                   |                        |
|------------------|----------------|-------------------|--------------|-------------------|------------------------|
| 魚種               | プロモーター<br>/遺伝子 | 電圧<br>(V/cm)      | 生残率<br>(%)   | 外来DNA<br>保有個体 (%) |                        |
| コイ               | RSV/lacZ       |                   | --           | 2.6               | (10日令または Muller et al. |
| ティラピア            | GMI4/CAT       | 750-2250          | --           | 3.2               | 1カ月令個体) (1992)         |
| アメリカナマズ          | RSV/lacZ       |                   | --           | 3.5               |                        |
| 受精卵への遺伝子導入       |                |                   |              |                   |                        |
| メダカ              | RSVLTR/tGHcDNA | 250<br>370<br>500 | 70<br>(孵化期)  | 20                | Lu and Chen<br>(1992)  |
| メダカ              |                | 500-750           | 25<br>(7日令胚) | 4                 | Inoue et al<br>(1992)  |

表 2 ニジマス精子への外来DNA導入

| プラスミド      | 電圧<br>(kV/cm) | 孵化率<br>(%) | 奇形率<br>(%) | 外来DNA保有個体 (%) |            |
|------------|---------------|------------|------------|---------------|------------|
|            |               |            |            | 直鎖型           | 環状型        |
| pGVC       | 1.00          | 75.4       | 5.7        | 33.3          | 77.7       |
| (SV40/luc) | 1.40          | 90.0       | 4.0        | 31.3          | 77.7 (14日令 |
|            | 1.80          | 90.0       | 3.7        | 20.0          | 77.7 個体)   |
|            | 1.85          | 80.6       | 2.5        | --            | 88.8       |
|            | 1.90          | 82.9       | 5.6        | --            | 62.5       |
|            | 2.00          | 75.9       | 3.4        | --            | 77.7       |

表 3 ホンモロコシ精子への外来DNA導入

| プラスミド          | 電圧<br>(kV/cm) | 孵化率<br>(%) | 奇形率<br>(%) | 外来DNA保有<br>個体 (%) |       |
|----------------|---------------|------------|------------|-------------------|-------|
| pmiWZ          | 0.8           | 81         | 0          | 0                 |       |
| (RSV-LTR、β-act | 1.0           | 91         | 2          | 0                 | (孵化期) |
| /lacZ) 直鎖型     | 1.4           | 34         | 0          | 0                 |       |
|                | 1.8           | 35         | 0          | 17                |       |

表 4 カワチバナへの外来DNA導入

| 受精卵への導入       |            |         |         |                |
|---------------|------------|---------|---------|----------------|
| プラスミド         | 電圧 (kV/cm) | 孵化率 (%) | 奇形率 (%) | 外来DNA保有 個体 (%) |
| p <i>miwZ</i> | 0.01       | 84      | 47      | 0              |
| 環状型           | 0.03       | 86      | 44      | 50 (孵化         |
|               | 0.05       | 77      | 39      | 30 期)          |
|               | 0.07       | 67      | 28      | 40             |

| 精子への導入        |            |         |         |                |
|---------------|------------|---------|---------|----------------|
| プラスミド         | 電圧 (kV/cm) | 孵化率 (%) | 奇形率 (%) | 外来DNA保有 個体 (%) |
| p <i>miwZ</i> |            |         |         |                |
| 環状型           | 1.0        | 53      | 13      | 0 (孵化          |
|               | 1.4        | 80      | 24      | 0 期)           |
|               | 1.8        | 79      | 10      | 23             |

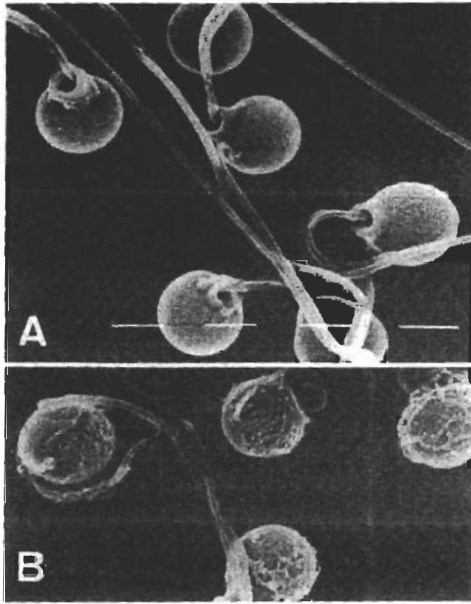


図1 エレクトロポレーション処理精子の形態  
A 無処理精子 B 処理精子

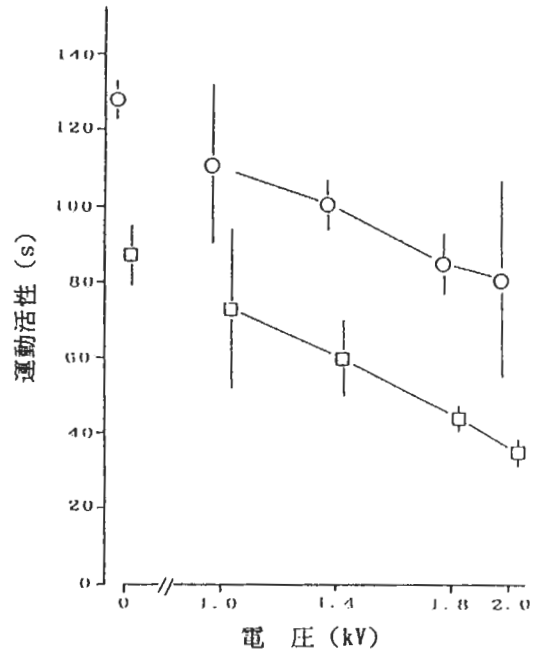


図2 エレクトロポレーション処理精子の活性