

平成 22 年 4 月 29 日現在

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2007～2009

課題番号：19658082

研究課題名（和文）海産魚における生殖細胞ゲノムへのインテグレートを目指した遺伝子導入法の開発

研究課題名（英文）Development of transgenic technologies for integration to germ line genome in marine finfish

研究代表者

家戸敬太郎（KATO KEITARO）

近畿大学・水産研究所・准教授

研究者番号：90330240

研究成果の概要（和文）：海産魚において、生殖細胞ゲノムへ取り込ませることのできる外来遺伝子導入方法を検討した。メダカのトランスポゾン DNA の転位部位への組込みを触媒する酵素である transposase が認識する配列を付加した発現ベクターを構築してマダイ受精卵に顕微注入した結果、12.4～14.7%の個体の鰭から GFP 遺伝子が検出され、ゲノムへのインテグレートを確認した。またそれらの個体の 16 尾中 1 尾の生殖腺組織からも GFP 遺伝子が検出された。また meganuclease の有用性についても検討した。

研究成果の概要（英文）：Transgenic technologies for genomic integration of the foreign genes were investigated in marine finfish. GFP expression vectors containing the sequence required for transposition were constructed and microinjected to fertilized eggs of red sea bream. GFP gene could be detected in fin sample of 12.4 – 14.7 % of the fish injected the vectors. This result suggests the integration of the transgene to genomic DNA. The transgene was also detected from the gonad of one of the fish. Availability of meganuclease was also investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	900,000	0	900,000
2009年度	700,000	0	700,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：育種学，遺伝子組換え，水産学，発生・分化

1. 研究開始当初の背景

トランスジェニック魚の作出技術は、近年著しく進歩し、メダカやゼブラフィッシュなどの小型実験魚ではほぼ完成され、医学領域を含む様々な研究目的で広く利用されるよう

になっている。しかし、海産養殖魚においては、発光タンパク質を発現させたり、鰭のゲノム DNA から導入遺伝子が検出されたりするところまでは数例の報告があるものの、導入した外来遺伝子が生殖細胞の染色体に取

り込まれて次世代まで遺伝した例はまだ報告されていない。

2. 研究の目的

(1) マイクロインジェクションにより、導入した外来遺伝子が生殖系列細胞ゲノムにインテグレートされたかどうかを容易に確認する方法を確立する目的で、生殖細胞特異的に発現するマダイ由来の *vasa* 遺伝子のプロモーターおよび 3' 下流領域をクローニングし、GFP を連結した発現ベクターを作成して生殖細胞の染色体への取り込みを確認するための指標となるかどうかについて検討した。

(2) 染色体への導入遺伝子の取り込み効率を増加させるための transposase の利用について検討した。transposase を酵素の状態で精製して利用するのは困難であるので mRNA の状態で導入遺伝子とともにマイクロインジェクションすること、および導入遺伝子の両端には transposase の認識配列を付与することを行った。このことによって、導入遺伝子の染色体への取り込み効率がかかなり向上することが期待された。

(3)(2)の実験で鰭ゲノム DNA への導入遺伝子のインテグレート効率を飛躍的に向上させることができたが、マダイ由来の transposase が機能している可能性が示された。マダイ由来の transposase が機能している場合には、次世代の配偶子内でも転移する可能性があり、その場合には安定したトランスジェニック系統の樹立は困難になると考えられた。そこで transposase 認識配列を使用せずに、meganuclease の認識配列をもつベクターおよび meganuclease を共インジェクションの有効性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 生殖細胞特異的に発現するマダイ由来の *vasa* 遺伝子のプロモーターおよび 3' 下流領域をマダイ生殖腺 cDNA およびマダイゲノム DNA よりクローニングし、GFP を連結した発現ベクターを作成してマダイ受精卵にマイクロインジェクションした。それらの卵を飼育して生殖細胞における GFP の発現を観察した。

(2) transposase の認識配列を導入遺伝子の両端に挿入した GFP 発現ベクターをマダイ受精卵にマイクロインジェクションし、稚魚期まで飼育後、鰭サンプルを採取して PCR 法によって GFP 遺伝子を検出した。また GFP 遺伝子が発見された魚については引き続き飼育後、生殖腺をサンプリングして生殖腺細胞からの GFP 遺伝子の検出も行った。

(3) α -アクチンプロモーターに GFP 遺伝子

を連結した DNA 断片の両端に mega-nuclease I-SceI の認識配列を付加したプラスミドベクターを作成し、meganuclease と共インジェクションしてその有効性について検討した。

4. 研究成果

(1) マダイ *vasa* 遺伝子のクローニングを行い、生殖腺の total RNA などから 2,427 bp の cDNA 配列を得た。この配列には 1,893 bp の open reading frame, 終始コドン(TAA)および 363bp の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) が含まれていた。cDNA 配列の翻訳領域から推定したアミノ酸配列は 631 残基で *vasa* の特徴を備えており、他の生物種の *vasa* と高い相同性を示したことからクローニングした遺伝子がマダイの *vasa* 遺伝子であることが示唆された。さらに、マダイのゲノム DNA からゲノムウォーキングおよび PCR 法によってクローニングされた遺伝子断片から 13,547 bp のゲノム DNA 配列を得た。その配列には翻訳領域と翻訳領域の上流域 (3,116bp) と翻訳領域下流域 (188bp) が含まれていた。このように全長 cDNA およびプロモーター領域を含む *vasa* 遺伝子のクローニングはこれまでにみられず、マダイでは初めてであった。

上記でクローニングされた *vasa* プロモーターと 3'UTR との間に GFP 遺伝子を連結し、その両端に transposase 認識配列を付加した発現ベクターを構築した。そのベクターをマイクロインジェクション法によってメダカ transposase の mRNA とともにマダイ受精卵に導入し、孵化後 20 日目に生殖細胞における *vasa*-GFP の発現を観察して作成されたベクターが機能するかどうかを確認した結果、生殖細胞があると思われる部位に GFP 様の蛍光がみられたもののマダイの自家蛍光と GFP による蛍光との識別が困難であった。

(2) 導入した個体を個体識別可能な大きさまで継続飼育して ID タグ標識するとともに鰭の一部を切り取りゲノム DNA を抽出して GFP 遺伝子の存在を PCR 法で確認した結果、12%以上の魚のゲノム DNA から GFP 遺伝子が発見され、導入した遺伝子の染色体への取り込みが確認された。

次に、メダカ transposase の mRNA の共インジェクションの有無の影響を調べたところ、孵化後 5 ヶ月目までに死亡した魚では mRNA 有りの場合 40%の個体から GFP 遺伝子が発見され、mRNA 無しの場合には 23%であった。一方、孵化後 5 ヶ月目まで生残した個体では、mRNA 有りが 12.4%、mRNA 無しが 12.5%と差異がみられなかった。従って、mRNA の共インジェクションの効果は無いことはないが、共インジェクションによって導入遺伝子のゲノムへの取り込みが急激に増

大し、生命維持に影響が出てしまうのかもしれない。

さらに、transposase 認識配列の有無の影響を調べた。その結果、transposase 認識配列をもつ発現ベクターを導入した場合には、mRNA の有無にかかわらず孵化後約5ヶ月目では12.4~14.7%の個体の鰭からGFP 遺伝子が検出されたが、transposase 認識配列をもたない発現ベクターを導入した場合にはGFP 遺伝子は検出されなかった。従って、ゲノムへのインテグレートにはtransposase 認識配列が必要であることが分かった。

また、前年度にGFP 遺伝子が鰭から検出された個体の生殖線をサンプリングし、生殖腺組織からGFP 遺伝子の検出を試みたところ、16尾中1尾が陽性であった。

以上のように、10%以上の高い割合で染色体DNAに外来遺伝子をインテグレートさせる技術をマダイで初めて開発できた。

(3) 秋季から冬季にかけて産卵する香港系統のマダイから採卵し、上記発現ベクターおよびI-SceIの共インジェクションを試みたが、卵質が悪く発生しなかった。そこで、急速マダイ4歳魚を陸上水槽に収容して蛍光灯による長日処理および加温によって成熟を誘導したところ、1月中旬から産卵を開始した。産卵が安定するのを待って、2月11日にマダイ受精卵へのマイクロインジェクションを再度行った。上記の発現ベクター100 ng / μ l とI-SceIを3 U / μ l および1 U / μ l の濃度で共インジェクションする試験区と、発現ベクターのみをインジェクションする対照区を設定し、各試験区とも1,000粒以上の卵にマイクロインジェクションした。その結果、3U区で230尾、1U区で315尾、対照区で309尾の孵化仔魚が得られ、3U区のみ骨格筋にGFPを発現する個体が認められた。

以上のように、meganucleaseを用いたトランスジェニック技術の有効性をマダイで初めて明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Miyamoto T, Momoi A, Kato K, Kondoh H, Tsukita S, Furuse M, Furutani-Seiki M. Generation of transgenic medaka expressing claudin7-EGFP for imaging of tight junctions in living medaka embryos. *Cell Tissue Res.* 335 (2), 2009, 465-471.
- ② Kohsuke Adachi, Keitaro Kato, Masayoshi Yamamoto, Katsuya Ishimaru,

Toru Kobayashi, Osamu Murata, Hidemi Kumai. Molecular cloning and daily mRNA levels of prolactin and somatolactin in aquacultured Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture*, 296 (1-2), 2009, 110-116.

- ③ Kohsuke Adachi, Keitaro Kato, Masayoshi Yamamoto, Katsuya Ishimaru, Toru Kobayashi, Osamu Murata, Hidemi Kumai. Pulsed expression of growth hormone mRNA in the pituitary of juvenile Pacific bluefin tuna under aquacultured conditions. *Aquaculture*, 281 (1-4), 2008, 158-161.
- ④ Keitaro Kato, Masayoshi Takagi, Yutaka Tamaru, Shin-ichi Akiyama, Takafumi Konishi, Osamu Murata, Hidemi Kumai. Construction of an expression vector containing a β -actin promoter region for gene transfer by microinjection in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*, 73 (2), 2007, 440-445.

[学会発表] (計6件)

- ① 家戸敬太郎・笹尾紘平・木下政人・豊原治彦・村田修. メダカトランスポゾンを利用したトランスジェニックマダイ作出に関する研究. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008
- ② 家戸敬太郎・笹尾紘平・木下政人・豊原治彦・村田修. トランスジェニックマダイの作出技術開発. 第11回マリンバイオテクノロジー学会大会シンポジウム「魚介類マリンバイオテクノロジーの最先端研究」, 京都, 2008
- ③ 笹尾紘平・常本和伸・家戸敬太郎・木下政人・豊原治彦・村田修・熊井英水. メダカトランスポゾンを利用したトランスジェニックマダイ作出に関する研究. 平成20年度日本水産学会春季大会静岡, 2008
- ④ 常本和伸・笹尾紘平・家戸敬太郎・木下政人・豊原治彦・村田修・熊井英水. マダイ生殖細胞系列特異的遺伝子の検索. 平成19年度日本水産学会近畿支部後期例会, 京都, 2007
- ⑤ 笹尾紘平・常本和伸・家戸敬太郎・木下政人・豊原治彦・村田修・熊井英水. マダイにおける vasa 遺伝子のクローニングと発現に関する研究. 平成19年度日本水産学会秋季大会, 函館, 2007
- ⑥ 常本和伸・笹尾紘平・家戸敬太郎・木下政人・豊原治彦・村田修・熊井英水. マダイ生殖細胞系列特異的発現遺伝子の検索. 平成19年度日本水産学会秋季大会, 函館, 2007

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

家戸 敬太郎 (KATO KEITARO)

近畿大学・水産研究所・准教授

研究者番号：90330240

(2) 研究分担者

豊原 治彦 (TOYOHARA HARUHIKO)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：09183079

木下 政人 (KINOSHIRA MASATO)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：60263125

(3) 連携研究者

()

研究者番号：