ミニシンポジウム 魚類における発生工学の現状と展望

モデル魚種における遺伝子導入研究の現状と水産への応用

木 下 政 人

京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻

Transgenesis in fish model and its application in fisheries

MASATO KINOSHITA

Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Kyoto 606-8502, Japan

メダカ、ゼブラフィッシュは、小型で飼育が容易である、卵が透明で胚発生の観察が容易である、世代時間が短い、遺伝子導入技術を含む各種実験方法が確立している、近年ゲノム情報が明らかになってきている、といった利点が存在する。メダカでは、これらに加えて、近交系が存在する、性決定遺伝子が同定されている、生息温度域が広い、精子の凍結保存が可能であるという特徴を持つ。このようなことから、メダカとゼブラフィッシュは、単に魚類の実験モデルとしてではなく、脊椎動物の有益なモデルとしてますます重要性が高まっている。一方、水産業上有用な魚種は大型であったり、世代時間が長いといった種が多く、実験には多くの困難と経費がつかまとう。モデル生物を用いることは、経費・時間等の節約となる。また、遺伝子導入技術を利用することにより生物体内で起こるさまざまな現象を容易に観察できるようにしたり、顕在化するといったことが可能になる。つまり、「水産の研究」においてもモデル生物を上手に利用して行くことで、この分野の発展が加速されると考えられる。この様な状態の中で、メダカ・ゼブラフィッシュにおける遺伝子導入技術を用いた研究の現状を紹介し、また、それらの水産への応用性について話題を提供する。

1) 遺伝子導入技術の現状

魚類での遺伝子導入技術が開発されてから約 20 年を経た。PubMed で 2001-2006 年間に発表された論文を (“medaka transgenic” or “medaka mutant”) または (“zebrafish transgenic” or “zebrafish mutant”) で検索するとそれぞれ 82 件、870 件表示される。それらの内容は、メダカでは環境学関連の研究数が増加しており、一方、ゼブラフィッシュでは発生学を中心とした基礎科学分野の研究が多く、近年環境学関連の研究発表が増加している。両モデル魚で環境学関連研究が増加しているのは、内分泌攪乱化学物質の生態影響試験魚として OECD テストガイドラインに盛り込まれたことが大きな要因と考えられる。

これまでに単に遺伝子 (DNA) を導入するだけでなく、RNA、核酸類似物、ケイジド化合物など、それぞれに特徴を持った物質が導入されるようになり、新規機能の付加、遺伝子発現抑制、レポーター遺伝子を用いた標識化などが行われている。遺伝子の導入方法としては、マイクロインジェクション法が依然主流であるが、マイクロバブル (蛋白質でできた微小な気泡) と超音波を用い細胞膜に穴を開けるソノポレーション法の開発も行われている。導入した遺伝子発現を時間空間的に厳密に制御する方法の開発が進んでおり、レーザーを用いた 1 細胞レベルでの遺伝子発現制御法、Cre-LoxP system を利用した発現制御法がその例である。レポーター遺伝子のバリエーションも増加した。中でも生きたまま標識物質を観察できる各種蛍光蛋白質が主流となっており、同一個体で組織別に色分けすることも可能となっている。

2) 遺伝子導入技術を用いた研究例

細胞・組織の標識化 特定の細胞、組織、器官の移動や構築をより詳細に、簡便に観察できるように標識化されたメダカ・ゼブラフィッシュが作出されている。それらの中では、神経細胞の標識化が数多く行われている。一例を挙げると、Sato らは神経の発達や維持に関与する *HuC* 遺伝子の発現制御領域と、レポーター遺伝子として *kaede* を用いたコンストラクトを導入したゼブラフィッシュを作成した。¹⁾ この系統では、通常神経細胞に緑色蛍光を有するが、405 nm レーザーを照射した細胞のみ赤色蛍光に変化する。そのため、1 つの細胞体から伸びる軸索を他の軸索から区別して観察できる。

環境モニター 先述のように、メダカ、ゼブラフィッシュが生態影響試験魚として OECD テストガイドラインに盛り込まれたことから、両モデル魚が盛んに活用されるようになってきている。2000 年に変異原物質を検出する遺伝子導入ゼブラフィッシュ²⁾ と遺伝子導入メダカ³⁾ が相次いで報告された。魚個体から回収可能なプラスミドまたはファージ DNA を持つ遺伝子導入魚を作出し、こ

これらの胚・成魚等を試料（変異原物質）に暴露した後、回収したプラスミドまたはファージ DNA 中の変異を検出するというものである。エストロゲン様物質を検出する遺伝子導入魚も複数作出されており、その検出法（センサー部分）もさまざまである。ゼブラフィッシュでは、エストロゲンレスポンスエレメントで検出し、ルシフェラーゼによる発光量でエストロゲン様物質料を評価する。⁴⁾ メダカでは卵膜蛋白質である Choriogenin H (ChgH) の発現調節領域、⁵⁾ または、ビテロゲニンの発現調節領域をセンサーに用い緑色蛍光によりエストロゲン様物質料を評価するものや、エストロゲンレセプターを過剰発現させメダカ生じる血栓によりエストロゲン様物質量を評価するものがある。⁶⁾

水産業への応用可能な研究 Sarmasik らは、⁷⁾ 昆虫が生体防御に用いている抗菌ペプチド、セクロピン類、の魚類への利用を検討している。メダカにこのセクロピンを過剰発現させ、バクテリアによる感染症の防御効果を検討した。その結果、感染が有意に抑制され、セクロピンの魚類での有効性を示した。また、直接水産業への応用を目指した研究ではないが、Acosta らは、ゼブラフィッシュを用い、標的遺伝子と相同の 2 本鎖 RNA を導入する RNA 干渉 (RNAi) を用いて骨格筋の分化・成長を阻害する myostatin の発現を抑制し、その効果を検討した。⁸⁾ その結果、筋肉量が増加し、顕著な体重増加傾向が観察された。つまり、水産学上の検知からすると、myostatin の発現をコントロールすることで、可食部の増量の可能性を示唆するものであった。

3) 今後の課題

現在の魚類での遺伝子導入技術では、導入する遺伝子を染色体の“特定の位置に”“決まった数だけ”“正確に”挿入することはできない。その結果、予期せぬ効果が出ることがある。以下にこの現象の筆者らの経験を紹介する。1) 肝臓で発現するはずの導入遺伝子が、前脳で強く発現する遺伝子導入系統が得られた。これは、導入遺伝子が前脳に発現を誘導するエンハンサーの近くに偶然挿入されたためだと考えられた（位置効果, positional effect）。2) 同一の導入遺伝子を挿入した 3 つの系統において、挿入された遺伝子コピー数が多い 2 つの系統では、致死となったが、挿入コピー数の少ない 1 系統

は、致死とはならなかった。これは、外来遺伝子が多量に染色体に組み込まれると、生物へ悪影響を及ぼすことを示した（多量挿入による悪影響）。3) レポーター遺伝子の染色体への挿入が確認されているにもかかわらず、その発現が観察されない。これは、発現調節領域の一部が欠落した導入遺伝子が挿入されたためであると考えられた（不正確な挿入）。

この様に現段階の遺伝子導入魚は、「得体の知れないもの」と思われても致し方ない状況である。今後、厳密な遺伝子導入法を確立し、「素性の明らかなもの」にしていく必要がある。

文 献

- 1) Sato T, Takahoko M, Okamoto H. HuC: Kaede, a useful tool to label neural morphologies in networks in vivo. *Genesis*. 2006; **44**: 136-142.
- 2) Amanuma K, Takeda H, Amanuma H, Aoki Y. Transgenic zebrafish for detecting mutations caused by compounds in aquatic environments. *Nature Biotechnol.* 2000; **18**: 62-65.
- 3) Winn RN, Norris MB, Brayer KJ, Torres C, Muller SL. Detection of mutations in transgenic fish carrying a bacteriophage lambda cII transgene target. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 12655-12660.
- 4) Legler J, Zeinstra LM, Schuitemaker F, Lanser PH, Bogerd J, Brouwer A, Vethaak AD, De Voogt P, Murk AJ, Van der Burg B. Comparison of *in vivo* and *in vitro* reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.* 2000; **34**: 4439-4444.
- 5) Kurauchi K, Nakaguchi Y, Tsutsumi M, Hori H, Kurihara R, Hashimoto S, Ohnuma R, Yamamoto Y, Matsuoka S, Kawai S, Hirata T, Kinoshita M. *In vivo* visual reporter system for detection of estrogen-like substances by transgenic medaka. *Environ. Sci. Technol.* 2005; **39**: 2762-2768.
- 6) Zeng Z, Shan T, Tong Y, Lam SH, Gong Z. Development of estrogen-responsive transgenic medaka for environmental monitoring of endocrine disrupters. *Environ. Sci. Technol.* 2005; **39**: 9001-9008.
- 7) Sugise T, Hayashida Y, Hanafusa T, Nanjo E, Yamashita I. Monitoring of vasculogenesis-inhibiting activities in sewage effluents by using medaka embryos. *Environ. Sci. Technol.* 2006; **40**: 2051-2055.
- 8) Sarmasik A, Warr G, Chen TT. Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens. *Mar. Biotechnol.* 2002; **4**: 310-322.
- 9) Acosta J, Carpio Y, Borroto I, Gonzalez O, Estrada MP. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J. Biotechnol.* 2005; **119**: 324-331.