

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

魚類への外来遺伝子導入に関する基礎的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 吉崎, 悟朗 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/731

魚類への外来遺伝子導入に 関する基礎的研究

平成4年度
(1992)

東京水産大学大学院
水産学研究科
資源育成学専攻

吉崎悟朗



目次

緒論	-	1
第1章 魚卵へのマイクロインジェクション技法の開発	-	4
第2章 魚類への外来遺伝子の導入	-	8
第1節 外来遺伝子注入ニジマス卵の初期生残	-	10
第2節 ニジマスにおける外来遺伝子の導入率および導入様式	-	16
第3節 外来遺伝子のニジマス初期胚における挙動	-	23
第4節 コイ精子へのエレクトロポレーションによる外来 遺伝子の導入	-	26
第3章 遺伝子導入魚における外来遺伝子の次世代への伝達	-	30
第1節 遺伝子導入ニジマス精子における外来遺伝子の存在	-	31
第2節 ニジマスに導入した外来遺伝子のF1およびF2への伝達	-	33
第4章 遺伝子導入魚における外来遺伝子の発現	-	39
第1節 ニジマスに導入したCAT遺伝子の初期胚における発現	-	41
第2節 ニジマスに導入したCAT遺伝子の稚魚における発現	-	45
第3節 ニジマスに導入したCAT遺伝子の次世代における発現	-	48
第4節 ニジマスにおける外来遺伝子発現のための有用 プロモーターの開発	-	51
第5章 魚類グロビン遺伝子発現調節機構の解明	-	55
第1節 ニジマスに導入したコイ α -グロビン遺伝子の発現	-	56

第2節	ニジマスにおけるコイ α -グロビン遺伝子5'上流域の機能	- 60
第3節	コイおよび成体で発現している β -グロビンcDNAの同定	- 66
総括		- 76
謝辞		- 79
参考文献		- 80
溶液組成一覧		- 95
図解説		- 97
図		-102
表		-144

緒言

近年の遺伝子操作技術の発達により、様々な生物の遺伝子が単離、解析されるようになった。さらに、1980年代に入って、これらの遺伝子を個体内に導入し、いわゆる遺伝子導入動物を作出する試みも種々の生物で行われている（村松, 1989）。個体への遺伝子導入技術は、目的の遺伝形質のみを個体に導入でき、導入した遺伝子が1度宿主の染色体中に組み込まれば、その遺伝子は次世代へ遺伝していくという利点を持つ。近年、これらの遺伝子導入技術は、遺伝子の生体内における機能を解析するため、マウス（Gordon and Ruddle, 1985）、ショウジョウバエ（Spradling and Rubin, 1982）などで広く用いられている。

従来、水産動物に目的の遺伝子を導入、固定するためには選抜や交雑等が行われてきたが、選抜には長い時間を必要とする上、有害遺伝子がホモ化し、表現型に悪影響を及ぼす危険性もある。さらに、交雑では親魚に用いることが可能な種類に限られるという問題点がある（加藤, 1982）。しかし、目的の形質を担うタンパク質が同定され、その遺伝子が単離されている場合、その遺伝子を個体に導入することにより、目的の形質のみを個体に短期間で付加できることが期待される。したがって、水産分野においてもこの方法は新しい有効な育種法として期待されている（Macleanら, 1987; Ozatoら, 1989; Maclean and Penman, 1990; Flercher and Davies, 1991）。実際、魚類の成長促進を期待して、哺乳類由来の成長ホルモン遺伝子がキングョ（Zhuら, 1985）、ドジョウ（Zhuら, 1986）、ニジマス（Chourroutら, 1986; Macleanら, 1987; Rokkonesら, 1989; Guyomardら, 1989; Penmanら, 1990）、チャンネルキャットフィッシュ（Dunhamら, 1987）、ティラピア（Bremら, 1988）、大西洋サケ（Rokkonesら, 1989）に導入されている。さらに、ニジマスの成長ホルモンcDNAもコイ（Zhangら, 1990）およびメダカ（Inoueら, 1990）に導入されている。また、大西洋サケに低温耐性を付加するために、南極圏に生息するwinterflounderの抗凍結タンパク質の遺伝子が導入されている（Fletcherら, 1988）。しかし、これらの報告の中で、外来遺伝子が宿主の個体内で発現し、外来遺

伝子由来のタンパク質が産生されたという報告は、Rokkonesら(1989)とZhangら(1990)による2例のみで、さらにその産物のタンパク質が宿主内で機能したという報告はZhangら(1990)による1例しかない。さらに、これらの外来遺伝子が次世代へ遺伝したという報告も少なく、ニジマス(Guyomardら, 1989)とコイ(Zhangら, 1990)で1例ずつあるのみである。このように、水産育種への応用を目的とした遺伝子導入魚の作出は極めて遅れており、その作出技法すら完成されたとは言い難い現状である。

一方、魚類の生理機能を解明するため、遺伝子導入魚を実験動物として利用する試みも数種でなされている。特に、メダカやゼブラフィッシュでは近交系も作出されており、性成熟に要する期間も短かいため、遺伝子導入個体作出の報告も多い。Ozatoら(1986)は、ニワトリの δ -クリスタリン遺伝子をメダカに導入し、その発現を報告している。さらに、Inoueら(1989)は、この実験系で導入された δ -クリスタリン遺伝子が発生の一時期において組織特異的に発現することを報告している。また、Chong and Vielkind(1989); Stuartら(1990); Tamiyaら(1990); Liuら(1990); Winklerら(1991)はメダカやゼブラフィッシュに導入したレポーター遺伝子が発現したことを報告している。しかし、これらの報告のほとんどは一過性の発現で、成魚あるいは次世代でも安定して発現したという報告はStuartら(1990)による1例のみである。このように遺伝子導入魚における外来遺伝子の遺伝様式、発現についての報告は非常に少ない上、魚類の内在性遺伝子の発現調節機構もほとんど解明されていない。

そこで、本研究では、目的の遺伝形質を魚類個体に導入し、その形質を保持した系統を作出するための基礎的研究を行った。まず、第1章では魚卵へ外来遺伝子をマイクロインジェクションするため、ニジマス卵の卵膜硬化を抑制する方法を開発し、続いてニジマス卵へのマイクロインジェクション法を開発した。第2章では、第1章で開発した方法を用い、種々の外来遺伝子をニジマス卵に導入し、その初期生残、外来遺伝子の導入率および導入様式について検討した。また、マイクロインジェクション後の外来遺伝子のニジマス胚体内での挙動を明らかにした。さらに、簡便な遺伝子導入魚の作出法として、精子へのエレクトロポレーション法を開発した。

第3章では遺伝子導入魚における外来遺伝子の次世代への伝達について検討した。すなわち遺伝子導入魚を育種に利用する際には、すべての種苗に確実に外来遺伝子を導入する必要があるため、外来遺伝子をホモに持つ個体の作出が望まれる。しかし、外来遺伝子の遺伝様式は魚類ではほとんど解明されていないため、まず、遺伝子導入ニジマスより搾出した精子における外来遺伝子の存在を確認し、次に、その精子を用いて作出したF1およびF2への外来遺伝子の伝達様式を解析した。さらに、遺伝子導入魚に目的の形質を付加するためには、外来遺伝子が転写、翻訳されて目的の形質を担うタンパク質が個体内で産生される必要がある。そこで、第4章では外来遺伝子が転写、翻訳されてタンパク質を産生する過程、すなわち発現について初期胚、稚魚、および次世代を用いて検討し、ニジマス個体内で有効なプロモーターの探索を行った。第5章では、将来遺伝子導入魚において外来遺伝子を効率良く、さらに正確に発現させるために必要と考えられる、魚類自身の遺伝子の発現調節機構を解明するための基礎研究を行った。まず、ニジマスに導入したコイ α -グロビン遺伝子の発現について解析し、さらに、その5'上流域のプロモーター活性を調べた。続いてコイ成魚で発現している β -グロビン分子を同定した。

第1章 魚卵へのマイクロインジェクション技法の開発

個体へ外来遺伝子を導入するには、マイクロインジェクション法を用いるのが最も一般的で、魚類においてもこれまで数種でマイクロインジェクション法が試みられている。しかし、魚類の卵はふ活後急激に卵膜が硬化し（隆島，1982）、マイクロインジェクションが非常に困難になる。この問題を克服するため、魚卵へ外来遺伝子をマイクロインジェクションするために種々の方法が開発されている。キンギョ（Zhuら，1985；Yamahaら，1988；Yoonら，1990）、ドジョウ（Zhuら，1986）、コイ（吉崎ら，1989）、ゼブラフィッシュ（Stuartら，1990）では種々のタンパク質分解酵素により卵膜を消化し、裸卵を得ることに成功している。また、Stuartら（1988）は実体顕微鏡下でピンセットによる卵膜の除去に成功しているが、これらの方法は生残率が低い上、卵膜の厚い魚種には利用できない。さらに、卵母細胞の卵核胞にマイクロインジェクションする方法（Ozatoら，1986）や、金属の針で卵膜に穴を開けてからマイクロインジェクションを行う方法（Chourroutら，1986）、また卵門からマイクロインジェクションする方法（Bremら，1988；Fletcherら，1988）なども開発されたが、これらの方法はどれも繁雑で効率の良い方法とは言い難い。一方、Macleanら（1987）；Penmanら（1990）は受精直後から卵膜が硬化するまでの間にマイクロインジェクションする方法を用いたが、この方法はマイクロインジェクションを行うことができる時間が限られるため、大量の卵に一度にマイクロインジェクションすることが困難である。

そこで本章では、効率が良く簡便なマイクロインジェクション法を開発を試みた。メダカ卵の卵膜は受精後S-S結合により硬化が促進されると推測されている（Nakano，1956；Ohtsuka，1960）。さらにIwamatsu（1983）は、S-S結合の阻害剤である還元型グルタチオン中で、メダカ卵を受精させることにより卵膜が膨潤し、はさみによる卵膜除去が容易に行えると報告している。そこで本研究では、還元型グルタチオンによりニジマスの卵膜硬化の抑制を試み、その硬化抑制能と、その後の生残率に及ぼす影響を検討した。さらに、本法を利用して卵膜硬化を抑制したニジマス卵にマイ

クロインジェクションを行う方法を開発した。

材料と方法

ニジマス親魚は、東京水産大学大泉実験実習場において、水温10℃で飼育した3年魚を用い、等調洗卵法によって媒精した。その後、pHを8および10に調整した0.5、1.0、2.0mMの還元型グルタチオン溶液中でふ活させ、それぞれの溶液中で受精後4時間培養し、各区の硬化抑制能を判定した。硬化抑制能の判定は、先端の外径が5~6 μm のマイクロピペットをマイクロマニピュレーターを用い卵膜に刺し、その貫通し易さにより行った。また、各区の受精率、孵化率を求めた。さらに、この方法により卵膜硬化を抑制した卵を用い、効率の良いマイクロインジェクション法の開発を試みた。

結果

還元型グルタチオン処理を施した区では、どの区も卵膜硬化は抑制されており、容易にマイクロピペットを卵膜に貫通させることができた(表1-1)。さらに受精率は79.2~96.7%と、どの区も対照区とほぼ同様で、孵化率は還元型グルタチオンの濃度が1.0mMおよび2.0mMの場合は、pH10の区で若干低かったものの、pH8の区では対照区とほとんど変わらず、この方法がニジマス卵の有効な卵膜硬化の抑制法であることが示唆された(表1-1)。さらに図1-1に示したように、本処理はニジマス卵の透明度に全く影響を与えず、胚盤を実体顕微鏡下で十分確認できるため、本法はニジマス卵へのマイクロインジェクションに有効な方法であることが判明した。

また、図1-2に示したようにニジマス用等調液を満たしたシャーレの底の凹部に卵を置き、上から針金の輪で押さえることによりマイクロインジェクションが容易に行えた。

考察

本法は通常の媒精を行った後、これらの卵を還元型グルタチオン溶液中でふ活させるだけで、効率良く卵膜の硬化を抑制でき、その後の生残率に悪影響を及ぼすこともなかった。このように、従来の卵膜除去法 (Zhuら, 1985; Yamahaら, 1988; Yoonら, 1990; Zhuら, 1986; 吉崎ら, 1989; Stuartら, 1988, 1990)、卵母細胞へのマイクロインジェクション法 (Ozatoら, 1986)、2-step法 (Chourroutら, 1986) および卵門からのマイクロインジェクション法 (Bremら, 1988; Fletcherら, 1988) に比べ、非常に簡単な操作のみでマイクロインジェクションが可能であった。さらに、本法はニジマス卵を10℃で培養した場合、胚盤が動物極に集積し始める受精後2時間から、第1卵割の始まる受精後8時間までの6時間にわたりマイクロインジェクションが可能である。したがって、卵膜の硬化が始まる以前にマイクロインジェクションを行うMacleanら (1987) や Penmanら (1990) の方法よりはるかに効率がよいと考えられる。特にサケ科魚類のように孵化日数が長く卵膜除去後の裸卵の培養が困難な種や、メダカやサケ科魚類のように卵膜が極めて強固で卵膜除去の困難な魚種には本法が適していると考えられる。

第2章 魚類への外来遺伝子導入

遺伝子導入技法により有用形質を付加した系統を作出する際、第一に外来遺伝子を個体に導入する必要がある。魚類でもメダカ (Ozatoら, 1986; Inoueら, 1989; Chong and Vielkind, 1989; Inoueら, 1990; Tamiyaら, 1990; Winklerら, 1991)、ゼブラフィッシュ (Stuartら, 1988, 1990; Liuら, 1990)、ドジョウ (Zhuら, 1986)、キンギョ (Zhuら, 1985)、コイ (Zhangら, 1990)、ティラピア (Bremら, 1988)、チャンネルキャットフィッシュ (Dunhamら, 1987)、大西洋サケ (Fletcherら, 1988; Rokkonesら, 1989)、ニジマス (Chourroutら, 1986; Macleanら, 1987; Rokkonesら, 1989; Guyomardら, 1989; Penmanら, 1990)に種々の方法を用いて外来遺伝子が導入されており、その生残率、遺伝子導入率が報告されている。そこで本章では、外来遺伝子を高率で個体に導入する方法を開発するため、第1章で開発したニジマス卵へのマイクロインジェクション法により実際に外来遺伝子の導入を試み、その後のニジマス卵の生残率、および外来遺伝子の導入率を検討した (第1節, 第2節)。さらに、これらの外来遺伝子が次世代へ遺伝していくためには、導入された外来遺伝子が宿主の染色体に組み込まれる必要がある。しかし、前述の報告の中で外来遺伝子の宿主染色体への組み込み、および、その存在様式を確認している報告はDunhamら (1987); Fletcherら (1988); Stuartら (1988, 1990); Chong and Vielkind (1989); Guyomardら (1989); Penmanら (1990); Zhangら (1990)による8例のみである。さらに、マイクロインジェクション後の宿主細胞内における外来遺伝子の挙動はメダカ (Chong and Vielkind, 1989)、ゼブラフィッシュ (Stuartら, 1988)で調べられたのみで、水産上有用種では全く検討されていない。しかし、このような外来遺伝子の挙動は、その宿主染色体への組み込みの機構を理解するためばかりでなく、外来遺伝子の発現および次世代への遺伝を理解する上でも極めて重要である。そこで、第3節ではニジマス受精卵に外来遺伝子をマイクロインジェクションし、その後の外来遺伝子の挙動を各発生段階ごとに検討した。さらに、第4節ではマイクロインジェクションより簡便な遺伝子導入技法を開発するため、

コイ精子にエレクトロポレーション処理を施し、その精子を通常のコイ卵に媒精することにより遺伝子導入魚の作出を試みた。

第1節 外来遺伝子注入ニジマス卵の初期生残

本節では第1章で開発した方法により、ラウス肉腫ウイルス（以下RSVとする）のロングターミナルリピート（以下LTRとする）に、大腸菌のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（以下CATとする）遺伝子を接続したRSVCAT、および同様にRSVのLTRにマグロ成長ホルモン（以下tGHとする）cDNAを接続したRSVtGHをニジマス卵にマイクロインジェクションし、その後の生残率について検討した。

材料と方法

プラスミドDNAの作製

1) pRSVCAT；図2-1に示したようにまずRc/RSV（Invitrogen Co.,Ltd.）を Eco T22 I（東洋紡績株式会社）、Pvu II（東洋紡績株式会社）により消化後、TBE bufferを用いた0.7%低融点アガロースゲル（Sea Plaque GTG Agarose; FMC Bioproducts Co.,Ltd.）電気泳動により各断片を分画後、村松ら（1988a）の方法により約2.7kbのRSVのLTRを含む断片を単離した。その後DNAライゲーションキット（宝酒造株式会社）により、再びRSVのLTRを含む断片を環状化し、大腸菌DH1株に村松ら（1988b）の方法によりトランスフォーメーションした。得られたコロニーから、プラスミドをアルカリ法（村松ら 1988c）で抽出後、Pst I（東洋紡績株式会社）により消化した。その後、0.7%アガロースゲル電気泳動によりその分子量を確認することにより、目的の約2.7kbのプラスミドを持つクローンを選択し、これをpRSVとした。続いてこのプラスミドをHind III（東洋紡績株式会社）、Bam HI（東洋紡績株式会社）により2重消化した後、フェノール抽出、エ

タノール沈殿によりこの断片を精製した。さらにpSV2CAT (Gorman ら 1982) を Hind III、Bam HIにより2重消化し、CAT遺伝子とシミアンバイラス40 (以下SV40とする) 由来のスプライシングシグナル、およびポリA付加シグナルを含む約1.6kbの断片を同様の方法で単離した。この断片を前述のpRSVのHind III、Bam HIサイトにDNAライゲーションキット (宝酒造株式会社) を用いてライゲーション後、村松ら (1988b) の方法に従って大腸菌DH1株にトランスフォーメーションした。その後、各コロニーからアルカリ法 (村松ら, 1988c) によりプラスミドを単離し、Bam HI消化後、電気泳動法により約4.3kbのプラスミドを選択し、以後の大量調整に用いた。

2) pRSVtGH; 図2-2に示したように、pBR322にクローニングされたtGHcDNA (Satoら 1988) を Nco I (東洋紡績株式会社) および Pvu IIによる2重消化後、前述の方法で単離し、DNAブランチングキット (宝酒造株式会社) により末端を平滑化した。pRSVはHind IIIによる消化後、同様に末端を平滑化した。その後、前述の方法でtGHcDNA断片をpRSVにライゲーションし、村松ら (1988b) の方法により大腸菌DH1にトランスフォーメーションした。得られたコロニーよりアルカリ法 (村松ら, 1988c) でプラスミドを抽出し、Eco RI (東洋紡績株式会社)、Pst Iによる2重消化により目的の方向にtGHcDNAがクローニングされているクローンを選び、以後の大量調整に用いた。

注入DNAの調整

pRSVCAT、pRSVtGHをトランスフォーメーションした大腸菌を200mlのLB培地に植菌し、37℃で1晩大量培養を行った。その後、村松ら (1988d) のプラスミドDNAの大量調整法 (アルカリ法) によりプラスミドDNAを調整した。続いて、DNA溶液をTEにて750 μ lに調整し、1250 μ lの塩化セシウム溶液 (1.2mg/ml)、50 μ lのエチジウムブロマイド溶液 (10mg/ml) と混合後、ベックマン (株) の2mlクイックシールチューブ (No.344625) に密封し、TLV 100K (ベックマン株) のローターを用いた密度勾配遠心 (100000rpm、16時間) により、プラスミドDNAを精製した。得られたプラスミドDNAは5M

NaClで飽和させたn-ブタノールによりエチジウムブロマイドを除き、その後TEに対して1晩透析を行うことにより、塩化セシウムを除去した。以後マイクロインジェクションに用いるプラスミドの大量調整は、すべてこの方法により行った。

pRSVCATは、Nru I (宝酒造株式会社)、Bam HIにより2重消化を行った後、2.05kbのRSVのLTR、CAT遺伝子、SV40由来のスプライシングシグナルおよびポリA付加配列を持つ断片を0.7%アガロースゲル電気泳動後、The GENE CLEAN Kit (Bio 101 Co., Ltd.)により単離、精製し、10mM Tris-HCl (pH8.0)、0.1mM EDTA溶液に11.2ng/ μ lとなるよう溶解した (図2-3)。

pRSVtGHも同様に、Nru I、Bam HIによる消化後、1.5kbのRSVのLTR、tGH cDNAを含む断片を単離し、10mM Tris-HCl (pH8.0)、0.1mM EDTA溶液に8.2ng、および82ng/ μ lとなるように溶解した (図2-4)。

マイクロインジェクション

東京水産大学大泉実験実習場において水温10°Cで育成されたニジマス3年魚のうち、良質の完熟卵を持つ個体を選び採卵に用いた。一方、精液は同2年魚より採取し、運動能の良好な精液のみを媒精に用いた。これらを等調洗卵法により媒精し、1.0mM還元型グルタチオン溶液中で吸水させた (吉崎ら, 1989)。その後、同溶液で10°Cにて2時間培養し、第1章で開発した方法を用いて、受精後5時間までの間に、胚盤の中央部に2n1の各DNA溶液をマイクロインジェクションした (2n1のDNA溶液中にRSVCATは 10^7 コピー、RSVtGHは8.2ng/ μ lのDNA溶液を用いた場合は 10^7 コピー、さらに、82ng/ μ lのDNA溶液を用いた場合には 10^8 コピーの外来遺伝子が含まれる)。その後10°Cで培養し、受精率、初期生残率を求めた。

結果

受精率は、RSVCATを 10^7 コピーずつマイクロインジェクションした区（以下RSVCAT 10^7 区）では、100%で、RSVtGHを 10^7 コピーずつマイクロインジェクションした区（以下RSVtGH 10^7 区）では98.3%、さらにRSVtGHを 10^8 コピーずつマイクロインジェクションした区では100%と、どの区においても非常に高い値であった（表2-1）。さらに、発眼率、孵化率、浮上率はRSVCAT 10^7 区では、各々対照区の96.3%、94.9%、95.9%、RSVtGH 10^7 区では同様に93.9%、88.9%、92.2%と極めて高い生残率であったが、RSVtGH 10^8 区では同様に75.0%、66.4%、67.3%と、 10^7 区と比べ比較的低い値であった（表2-1）。なお、浮上稚魚の外観および行動は、対照区とほぼ同様で、その後も順調に成長した。

考察

本研究では 10^7 区で孵化率は90%前後と、極めて高い値を示したが、 10^8 区では孵化率66.4%と、 10^7 区の値よりは低い値であった。第1章での還元型グルタチオン処理では、このような初期生残率の低下は認められなかった点を考慮すると、これらの初期生残率の低下は、明らかに外来遺伝子のマイクロインジェクションによる影響と考えられる。本研究では、RSVCAT 10^7 区では11.2ng/ μ lのDNA溶液を用い、RSVtGH 10^7 区および 10^8 区では各々8.2ng/ μ l、82ng/ μ lのDNA溶液を用いた。Hoganら(1986)はマウスの雄性前核に、10ng/ μ l以上のDNA溶液をマイクロインジェクションした場合、胚の生残率が著しく低下することを確認している。さらに、Stuartら(1988)はゼブラフィッシュの1細胞期の卵の胚盤に、15ng/ μ lから300ng/ μ lまでの各濃度のDNA溶液をマイクロインジェクションすると、10日胚における生残率が43%から3%にまで減少することを示している。またPenmanら(1990)も同様にニジマス卵の1細胞期の細胞質に 10^6 コピーから 10^8 コピーの外来遺伝子をマイクロインジェクションした場合、 10^6 区では、用いた2系統において浮上期での生残率が12%、35%であるのに対して、 10^8 区では各系統で5%、25%と低下したことを報告している。さらに、Guyomardら(1989)は0.2ngのDNAをニジマスの受精卵にマイクロインジェクションした場合、対照区の60~80%の生残率であったのに対し、0.5ngのDNAをマイクロインジェクションした場合、生残率は対照区の20%程度であったと報告している。このように大量の外来遺伝子を細胞内にマイクロインジェクションすることは明らかに宿主の細胞に有害であり、今回の実験でもこれらの報告を支持する結果が得られた。しかし、本研究では 10^8 区においても孵化率は66.4%、浮上率は64.3%と比較的高く、実用上十分に使用可能な値であったため、両濃度における外来遺伝子の導入率を踏まえた上で、マイクロインジェクションに用いるDNA溶液の適切な濃度を検討する必要があると考えられる。

しかし、従来の遺伝子導入魚の報告には、生残率がかなり低い例が多く、多量のDNA溶液を(DNA溶液の濃度が低くても)マイクロインジェクション

した報告において、特に生残率が低かった。Dunhamら（1987）はチャンネルキャットフィッシュの受精卵に、 10^6 コピーの外来遺伝子を含む20nlのDNA溶液をマイクロインジェクションした結果、孵化率は13%だったと報告している。また、Rokkonesら（1989）は 10^9 コピーの外来遺伝子を含む10nlのDNA溶液をニジマス受精卵にマイクロインジェクションし、30%の孵化率を得ている。さらに、Zhangら（1990）は、コイ受精卵に 10^6 コピーの外来遺伝子を含む20nlのDNA溶液をマイクロインジェクションし、受精後4か月での生残率は37%だったと報告している。一方、Ozatoら（1986）により開発されたメダカの卵母細胞の卵核胞にマイクロインジェクションする方法では、DNA溶液の量、濃度ともに低いにもかかわらず、7日胚の生残率が48%と低く、同様の方法を用いたInoueら（1990）の報告においても孵化率が37%と低い生残率しか得られていない。このように、本研究で得られた生残率は、これらの報告に比べ極めて高かった。また、大西洋サケ（Fletcherら 1988）、およびティラピア（Bremら 1989）で、孵化率が80%だったという報告があるが、これらはともに 10^6 コピーの外来遺伝子を数nlに溶解し、受精卵にマイクロインジェクションしており、本研究のように多コピーの外来遺伝子を導入した場合に高生残率が得られた報告は非常に少ない。これは還元型グルタチオン処理を施したニジマス卵を用いることによって、非常にマイクロインジェクションが容易に、かつ正確に行えたため、卵への物理的傷害が他の方法に比べ少なかったためではないかと思われる。また、供試卵の卵質が極めて重要な要因であると推測されたため、親魚の選択は慎重に行う必要があると思われる。

第2節 ニジマスにおける外来遺伝子の導入率および導入様式

本節では第1章で開発したマイクロインジェクション法を用い、外来遺伝子のニジマスへの導入を試み、各区における外来遺伝子の導入率を検討した。さらに宿主細胞内における外来遺伝子の存在様式および宿主染色体への外来遺伝子の組み込みの有無を検討した。

材料と方法

マイクロインジェクションとサンプリング

第1節と同様にRSVCATを 10^7 コピー、RSVtGHを 10^7 コピーおよび 10^8 コピーずつニジマス受精卵の1細胞期の細胞質にマイクロインジェクションした。DNAの抽出には、RSVCAT注入区では受精後70日の稚魚10尾を正中線に沿って左右に分け、右半分を用いた（なお、左半分は第4章においてタンパク質の抽出に用いた）。一方、RSVtGH注入区では受精後60日の稚魚各17尾を用いた。

DNAの抽出

尾部筋肉50mgを採取し、 $750\mu\text{l}$ のLysis buffer中で磨碎した。その後、Proteinase K (Boehringer Co., Ltd) 溶液 (10mg/ml) を $35\mu\text{l}$ 加え、 60°C で1晩ゆるく旋回し、タンパク質を分解した。続いてTEフェノールで3回抽出を行い、次に 10mg/ml のRNase Aを $5\mu\text{l}$ ずつ加え、RNAを分解した。次に、フェノール抽出を1回行い、上清を 10mM Tris (pH 8.0)- 0.1mM EDTA溶液に対して 4°C で1晩透析を行いDNAを精製した。その後、スポット法（勝木ら1987a）によりDNAの濃度を測定し、各 $10\mu\text{g}$ 分を以後のサザンブロット解

析に用いた。

サザンプロット解析

外来遺伝子の導入率の解析は、外来遺伝子断片を制限酵素で2か所で切断して行った。この場合、外来遺伝子が個体内に存在すれば、これらの切断点にはさまれた断片が必ず生じるため、外来遺伝子の存在様式によらず、常に一定の分子量のシグナルが検出されることが期待される。本研究ではRSVCAT導入区ではHind IIIとHinc II（東洋紡績株式会社）を用い（図2-3）、RSVtGH導入区ではEco RI（図2-4）を用いた。そこで各外来遺伝子をマイクロインジェクションした個体のDNA、およびネガティブコントロールとして通常のニジマスから抽出したDNAを前述の制限酵素で消化後、TBE bufferを用いた1.0%のアガロースゲル電気泳動を行い、Sambrookら（1988）の方法によりナイロンメンブレン（Hybond N, Amersham Co., Ltd）にプロットした。なお、ポジティブコントロールにはニジマスの細胞内に1、10、100コピーの外来遺伝子が存在した場合に相当すると考えられる量のRSVCATとRSVtGHを、通常のニジマスDNAに混ぜて実験に供した。その後、勝木ら（1987b）の方法によりプレハイブリダイゼーションを42℃で3時間、ハイブリダイゼーションを42℃で16時間行った。なおプローブにはマイクロインジェクションに用いた各DNA断片をDeoxycytidine 5'-(α -³²P) triphosphate, triethylammonium salt (3000ci/mmol) (Bresatec Co., Ltd.)を用い Random Primed DNA Labeling Kit (United States Biochemical Co., Ltd.)により標識した。メンブレンの洗浄は2×SSPEで室温にて15分、1×SSPE、0.5% SDSで60℃にて15分、さらに0.2×SSPE、0.5% SDSで60℃にて15分を行い、その後オートラジオグラフィーを1~4日間行った。

さらに、RSVCATマイクロインジェクション区でRSVCATの導入が確認された個体のDNAを用い、外来遺伝子の宿主細胞内における存在様式を解析した。そこで、RSVCAT内に1か所の切断点を持つHind IIIでRSVCAT導入個体のDNAを切断後、前述の方法でサザンプロット解析を行った。また、未消化のDNAとRSVCAT内に切断点の存在しないPst I消化DNAを同時に電気泳動後、サザンプロット解析を行うことによって、RSVCATの宿主染色体中への組み

込みの有無を検討した。

結果

図2-5にRSVCATをマイクロインジェクションした卵より孵化した稚魚10尾のDNAを用いて行ったサザンブロット解析の結果を示した。Hind IIIとHinc IIは各々RSVCAT内に1か所ずつの切断点をもつため(図2-3)、これらの酵素で2重消化すると、必ず約1.5kbの断片が生じる。P1~100はニジマス1細胞当たり1~100コピーのRSVCATが存在した場合に相当するポジティブコントロールで、この1.5kbのシグナルが確認できた。さらに、供試魚10検体中No1~6の6検体でも1.5kbのシグナルが認められ、通常のニジマスより抽出したDNAを用いたネガティブコントロール(N)では全くシグナルは認められなかったことから、これらの6検体では、RSVCATが導入されていることが明らかになった。さらに、これらのシグナルの強さをP1、P10、P100と比較し、宿主のニジマス1細胞当りに導入されている外来遺伝子の平均コピー数を推測した結果、No.6では約10コピー程度、Nos.2、3では数コピー、No.4では1コピーで、Nos.1、5では1細胞当たり平均1コピー未満しか存在しなかった。

さらに、RSVtGHの 10^7 区の結果を図2-6に示した。図2-4に示したようにRSVtGHをEco RIで消化すると1.25kbの断片が生じるが、この1.25kbのシグナルがNos.1,2,4,6,7,11,12,13,14,15,16,17の12検体で認められ、全体の70.5%にRSVCATが導入できた。また、RSVtGHの 10^8 区でも同様に14以外のすべての個体でRSVtGHの導入が確認でき、94.1%の高導入率であった(図2-6)。このように、 10^7 区では、導入率は60%および70.5%であったが、 10^8 区では94.1%と極めて高い値であった。

またRSVCATの導入が確認できた6検体のDNAをHind III消化後に行ったサ

ザンプロット解析の結果を図2-7に示した。Hind IIIはRSVCAT内に1か所の切断点を持つため、RSVCAT断片を単独でHind III消化すると0.4kbと1.65kbの断片が生じる。PはRSVCATをHind III消化後に泳動した区であるが、0.4kbと1.65kbのシグナルが認められる。ところが、RSVCATがニジマス細胞内でhead-to-headのコンカテマーを形成していると、Hind III消化によりこれらの1.65kbと0.4kbの断片がつながった2.05kbの断片が生じる。さらに、tail-to-tailのコンカテマーを形成した場合、1.65kbの断片が2本つながった3.3kbの断片が生じると考えられる(図2-7右)。図2-7の左に示したように、これらの6検体すべてで2.05kbと3.3kbのバンドが認められ、これらの検体でRSVCATはhead-to-tail、およびtail-to-tailのコンカテマーを形成して存在していることが示された。

次に、外来遺伝子が宿主の染色体に組み込まれているかを確認するため、前述の6検体のDNAを用い、未消化の状態とPst Iで消化した状態のDNAを同時に電気泳動し、サザンプロット解析を行った。Pst IはRSVCATを切断しないため、図2-8の下に示したようにRSVCATのコンカテマーが宿主の染色体に組み込まれなかった時は、未消化の場合もPst I消化の場合もRSVCATのコンカテマー自身の大きさの断片が生じる。一方、RSVCATのコンカテマーが宿主の染色体に組み込まれた場合、Pst IはRSVCATが染色体に組み込まれた位置の近傍の宿主染色体上に存在するPst Iサイトで切断する。したがって、サザンプロット解析の結果、RSVCATのコンカテマーと、その近傍のPst Iサイトまでのニジマス染色体DNAの断片が連結した分子量のシグナルが認められるはずである。しかし、未消化のDNAを用いた場合、そのシグナルは宿主の染色体と同じ、極めて高分子の位置にシグナルは認められるはずで、そのシグナルはPst I消化したサンプルより高分子側に位置するはずである。本研究では1~6のすべての検体において、未消化DNAを用いた場合のシグナルはPst I消化した場合より高分子側に存在し、これらの検体内でRSVCATのコンカテマーが宿主の染色体中に組み込まれて存在していることが判明した。

考察

本研究でのニジマスへの外来遺伝子の導入率は、 10^7 区では60%および70.5%で、 10^8 区では94.1%の高導入率であった。このように、還元型グルタチオン処理を施したニジマス受精卵の1細胞期の細胞質に、外来遺伝子をマイクロインジェクションすることにより、極めて効率良く遺伝子導入魚を作出することができた。これは第1章で開発した方法により極めて容易にマイクロインジェクションが行えたため、卵に物理的傷害を加えることが少なかった上、胚盤の中央部に正確に外来遺伝子を注入できたためと考えられる。Palmiterら(1985)はマウスにおいて超らせん状の外来遺伝子をマイクロインジェクションすると5.2%の導入率であったのに対し、直鎖状の外来遺伝子を用いると、遺伝子導入率は25.5%にまで上昇したと報告している。また、Chourroutら(1986)はニジマス卵へ環状の外来遺伝子をマイクロインジェクションすると導入率は40%であったのに対し、直鎖状の外来遺伝子を用いた場合、75%にまで遺伝子導入率が上昇したと述べている。したがって、本研究でマイクロインジェクションに直鎖状の外来遺伝子を用いた点も、導入率の向上に貢献していると考えられる。さらに、外来遺伝子のマイクロインジェクション量が多い区で、特に外来遺伝子導入率が高かったが、同様の傾向はGuyomardら(1989)、Penmanら(1990)によっても確認されている。Guyomardら(1989)は0.2ngの外来遺伝子をニジマス受精卵の1細胞期の細胞質にマイクロインジェクションした結果41.8%の個体に外来遺伝子が導入されたのに対し、0.5ngの外来遺伝子をマイクロインジェクションした場合には、74.4%の個体に外来遺伝子を導入できたと報告している。一方、Penmanら(1990)は 10^6 コピーの外来遺伝子を、ニジマス受精卵の1細胞期の細胞質にマイクロインジェクションしたところ、遺伝子導入魚は得られなかったのに対し、 10^7 コピーおよび 10^8 コピーずつマイクロインジェクションした場合には、各々4%、18%の導入率が得られたと報告している。さらに、 10^6 コピーの外来遺伝子を1細胞期の卵の細胞質にマイクロインジェクションした場合、その導入率はチャンネルキャットフィッシュで20% (Dunhamら, 1987)、ティラピアで6%

(Bremら, 1988)、大西洋サケで6.7% (Fletcherら, 1988)、コイで5.5% (Zhangら, 1990)といずれも低い値であった。一方、Chourroutら (1986)、Rokkonesら (1989)は、 10^9 コピーの外来遺伝子をニジマス受精卵にマイクロインジェクションした結果、ともに75%の導入率を得ている。このように、遺伝子導入魚を作出する際には、多量の外来遺伝子をマイクロインジェクションした方が導入率が高くなる傾向が認められている。しかし、第1節で検討したように、マイクロインジェクションする外来遺伝子のコピー数を増やすとそれに伴って生残率も低下した。そこで、外来遺伝子をマイクロインジェクションした卵数に対して、得られた遺伝子導入魚の割合を孵化率×導入率により求めると、RSVtGH 10^7 区では $83.6\% \times 70.6\% = 59.0\%$ 、さらにRSVtGH 10^8 区では、 $66.4\% \times 94.1\% = 62.5\%$ となり、同じ導入遺伝子を用いた場合は、得られた遺伝子導入魚の総数はほぼ同じ尾数であった。しかし、マイクロインジェクションした卵より生じた個体の中から、サザンプロット解析などにより遺伝子導入個体を選別するには多大な時間、費用、および労力を必要とするため、通常の遺伝子導入魚を作出するには 10^8 コピーの外来遺伝子をマイクロインジェクションした方が効率が良いと考えられた。最近、外来遺伝子をマイクロインジェクションする時期が遺伝子導入率に影響を与えるとの報告もあり (Penmanら 1990; Hayatら 1991)、今後これらの点も含めてより詳細に検討する必要があると思われる。

外来遺伝子は、宿主染色体中にコンカテマーを形成して存在していたが、このようなコンカテマーは、マウス (Costantini and Lacy, 1981)、ウニ (McMahonら, 1985)、チャンネルキャットフィッシュ (Dunhamら, 1987)、ニジマス (Guyomardら, 1989; Penmanら, 1990)、ゼブラフィッシュ (Stuartら, 1988; Chong and Vieikind, 1989)、メダカ (Chong and Vielkind, 1989)、コイ (Zhangら, 1990) などにおいても観察されており、遺伝子導入動物では一般的に起き得る現象と考えられる。一般に、遺伝子導入マウスを作出する際に、外来遺伝子は雄性前核にマイクロインジェクションするのが一般的であるが (Hoganら, 1986b)、この方法で作出されたマウスでは外来遺伝子のほとんどは、head-to-tailのコンカテマー

を形成する (Gordon and Ruddle, 1985)。これはマイクロインジェクション後、宿主細胞内で環状化された外来遺伝子が、既に染色体に組み込まれている外来遺伝子との間で、相同組み換えを繰り返すために生じるのではないかと推測されている (Bishop and Smith, 1989)。本研究でもhead-to-tailのコンカテマーは最も多く観察されたが、これもマウスと同様の現象によるのではないかと考えられる。しかし本研究で確認されたtail-to-tailのコンカテマーは相同組み換えでは起き得ない構造である。外来遺伝子の宿主染色体中への組み込みの機構はほとんど明らかにされていないが、マウスでは、外来遺伝子の組み込まれる位置はランダムであり、通常染色体上の1か所で起きると考えられている(勝木ら, 1987d)。したがって、外来遺伝子が宿主の染色体に組み込まれた後に、再度、その近傍に外来遺伝子が非相同組み換えにより組み込まれる確率は極めて低いと思われる。そこで、このようなhead-to-tail以外のコンカテマーは染色体中に組み込まれる以前に連結し、その後染色体中に組み込まれたのではないかと推測される。遺伝子導入魚は一般に、受精卵の細胞質に外来遺伝子をマイクロインジェクションすることにより作出されるため、染色体外で様々なコンカテマーを形成する機会が、マウスに比べ多かったのではないかと推測される。今後、遺伝子導入魚を安定して作出するためには、このような外来遺伝子の宿主染色体への組み込みの機構を明らかにする必要があると考えられる。

第3節 外来遺伝子のニジマス初期胚における挙動

ニジマス受精卵1細胞期の細胞質に外来遺伝子をマイクロインジェクションすることにより、宿主の染色体に外来遺伝子を組み込むことができたが、その組み込みの機構を解明することは、外来遺伝子の次世代への伝達、さらに発現機構を理解する上でも重要である。そこで、マイクロインジェクション後の外来遺伝子の宿主細胞内における挙動を明らかにするため、pSV2CATおよびRSVCATをマイクロインジェクションしたニジマス卵に含まれる外来遺伝子の量を32細胞期、桑実胚期、胞胚期、囊胚期、神経胚期、12日胚期、発眼期、孵化稚魚において定量した。

材料と方法

Pvu II、Bam HIによる2重消化によりベクターを除去したpSV2CAT (図2-9) およびRSVCAT (図2-3) を、 10^7 コピーずつ第1節と同様の方法で、ニジマス受精卵の1細胞期の細胞質にマイクロインジェクションした。その後、 10°C で培養し、受精後20~22時間(32細胞期)、30~32時間(桑実胚期)、3日(胞胚期)、5日(囊胚期)、7日(神経胚期)、12日(12日胚期)、20日(発眼)、32日(孵化)に各10粒ずつサンプリングし、DNAを抽出後、サザンブロット解析に用いた。なお、DNAの抽出およびサザンブロット解析は第2節と同様の方法を用いて行った。なお、両区ともHind III、Hinc IIによる2重消化後、電気泳動に供した。DNAはpSV2CATをマイクロインジェクションした区では32細胞期で1ng、桑実胚で8ng、胞胚で $0.8\mu\text{g}$ 、囊胚で $2.8\mu\text{g}$ 、神経胚で $4.9\mu\text{g}$ 、12日胚以降では $10\mu\text{g}$ ずつ用いた。RSVCATをマイクロインジェクションした区では神経胚までは順に1ng、8ng、 $0.8\mu\text{g}$ 、 $7.8\mu\text{g}$ 、 $8.3\mu\text{g}$ ずつ用い12日胚以降は $10\mu\text{g}$ ずつ用いた。その後、

得られたオートラジオグラフィーの各シグナルの強さをデンシトメーターで定量し、各シグナル中の外来遺伝子の量を求めた。

結果

図2-9に宿主の全DNA10 μ gあたりの外来遺伝子の量をグラフで示した。宿主細胞内における全DNA量は大幅には変化しないと考えられるため、この値は宿主の1細胞あたりに含まれる外来遺伝子の概量と考えることができる。本研究では約20pgの外来遺伝子を1細胞期卵の細胞質にマイクロインジェクションしたが、この1細胞期の細胞中に含まれる核DNAの量は約5.6pgと推測されている (Borutraeger and Stuttgart, 1974)。したがって、マイクロインジェクションされた外来遺伝子の量を、宿主のDNA10 μ g当たりの量に換算すると、 $20\text{pg} \times 10\mu\text{g} / 5.6\text{pg} = 36\mu\text{g}$ ということになる。このように1細胞期の細胞質にマイクロインジェクションされた36 μ g相当の外来遺伝子は、32細胞期にはpSV2CATで3.6 μ gにまで、さらに、RSVCATでは530ngまで減少し、その後も12日胚まで徐々に減少した。また、12日胚以降は極めて少量の外来遺伝子のみがほぼ安定して残存した。

考察

1細胞期の細胞質にマイクロインジェクションされた外来遺伝子は、細胞分裂が進むにつれ、その細胞内における濃度は減少した。しかし、導入された外来遺伝子 $36\mu\text{g}$ （宿主DNA $10\mu\text{g}$ 当たり）が増幅すること無く32個の細胞に分配されると、各細胞に存在すると考えられる外来遺伝子量は $36 \div 32 = 1.125\mu\text{g}$ と推測される。しかし、pSV2CAT導入区では、32細胞期の胚に存在した外来遺伝子の量は $3.6\mu\text{g}$ ずつと、明らかに $1.125\mu\text{g}$ より大きく、これらの細胞内で外来遺伝子が増幅されたことが示唆された。このような外来遺伝子の増幅は線虫（Stinchcombら, 1985）；ウニ（McMahonら, 1985）；Xenopus（Rusconiら, 1981）；ゼブラフィッシュ（Stuartら, 1988）；メダカ（Chong and Vielkind, 1989）においても報告されている。さらに、12日胚以降外来遺伝子の量は安定したが、これはこのステージより以前に、宿主の染色体に組み込まれていない外来遺伝子がほとんど分解され、染色体に組み込まれた外来遺伝子のみが安定な状態で残存したのではないかと推測される。Stuartら（1988）；Chong and Vielkind（1989）はゼブラフィッシュおよびメダカにおいて、1細胞期の細胞質にマイクロインジェクションされた外来遺伝子の胚体当たりの量は胞胚および囊胚までに約10倍増幅されると報告している。しかし、この間に細胞数は数千倍に分裂すると考えられるため（Kimmelら 1980）、1細胞当りの外来遺伝子の量は逆に減少していることになる。このように、宿主細胞内に導入された外来遺伝子は徐々に増幅するが、その速度は細胞分裂による外来遺伝子の希釈より遅く、結果として1細胞当たりの外来遺伝子量は減少した。さらに、これらの外来遺伝子は12日胚前後にはすでに宿主の染色体に組み込まれており、染色体外に存在した外来遺伝子は、この時期までにはほとんど分解すると考えられた。

第4節 コイ精子へのエレクトロポレーションによる外来遺伝子の導入

第1章で開発したマイクロインジェクション法により、効率よく遺伝子導入魚を作ることができたが、この方法は短時間に作出できる個体数が限られる上、熟練を要する。そこで、一度に多数の個体を処理でき、特別な技術を必要とせず、さらに多くの魚種への応用が可能な精子へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入法の開発を試みた。これは、細胞に電気パルスを加えることによって生じた一過性の細胞膜の穴から、DNA溶液が細胞内に流入することにより細胞内に外来遺伝子を導入する方法である。そこでまず、加えるパルス幅が精子の運動能に与える影響を検討し、これらのデータをもとに実際にDNA溶液中で精子にパルスを加えた後、卵に媒精することにより得られた個体の初期生残率、および外来遺伝子導入率について検討した。

材料と方法

供試精子

東京水産大学吉田実験実習場の屋外池で飼育されたコイより採精し、水で希釈後、直ちに顕微鏡下で運動能を確認し、隆島（1982a）の方法により1/1+++の精子のみを以後の実験に用いた。

プラスミドDNA

Gormanら（1982a）により作出されたpSV2CATを環状のまま2 μ g/mlとなるように淡水魚用リングル液（Yamamoto, 1939）に溶解し、この液で精液を10倍に希釈してパルス処理に供した。

エレクトロポレーション処理

電気パルス発生器は、島津製作所（株）のSSH-1を用い、チャンバーは同FTC-13を用いた。一般に、細胞の膜破壊に必要な電界強度は $2 \times$ 細胞膜間印加電圧/ $3 \times$ 細胞半径で求められる。そこで、細胞膜印加電圧には一般に用いられている1を、さらに、細胞半径にはコイ精子の頭部の半径である $1.2 \mu\text{m}$ (Kudo, 1980)をこの式に代入すると、電界強度 $= 5.5 \text{KV/cm}$ となる。しかし本研究で用いたパルス発生器の最大値が 3.5KV/cm であるため、この値で以後の実験を行った。そこでまずパルス幅が淡水魚用リングル液で希釈したコイ精子の運動能に与える影響を検討するため、4尾の雄親魚由来の精子希釈液に200、300、400および $500 \mu\text{秒}$ のパルス幅の矩形波を1回加え、その後の精子の運動能を隆島（1982）の方法により解析した。さらに、得られたデータをもとにpSV2CAT溶液中で精子にパルスを加え、通常のコイ卵に媒精後、その受精率、および孵化率を調べた。

供試卵

東京水産大学吉田実験実習場の屋外池で飼育されたコイから、カニキュレーションにより卵母細胞を摘出し、卵黄蓄積が十分に進んだ個体を親魚に用いた。これらの親魚の体重1kg当たり、ハクレン脳下垂体10mgを腹腔内に投与した後、約 22°C で蓄養した。その後、経時的に排卵の有無を確認し、排卵した卵は直ちに受精した。

DNA解析

DNAは受精後60~100日の稚魚の尾部筋肉より第2節と同様の方法で抽出した。サザンブロット解析は、Pst I消化DNAを用い、プローブにはBam HI消化により直鎖化したpSV2CAT全長を用いた。なお、他の条件は第2節と全く同じ方法で行った。

結果

表2-2に各親魚由来の精子の運動能に及ぼすパルス幅の影響を示した。一般にパルス幅は大きい程、細胞膜破壊は大きく、外来遺伝子の導入率は上昇する。しかし、それに伴い細胞へのダメージも大きくなるため、細胞の生残率も低下する。本研究で用いた4区の精子のうちNos.2、3のように500 μ 秒のパルスを加えるとほとんど運動しない区も存在したが、Nos.1、4のように40~60%の精子が運動する区も存在し、親魚により大きな個体差があった。なお、運動精子の運動形態は全ての区で+++で運動時間も1分以上であった。したがって、以後の実験には電界強度3.5KV/cmでパルス幅500 μ 秒のパルスを加え、運動精子の割合が50%以上の親魚の精液のみを選んで用いた。

次に、pSV2CATを溶解した淡水魚用リングル液で希釈した精子に前述のパルスを加え、卵4056粒に媒精した結果、受精率は50.5%、孵化率は24.65%で、各々対照区の78.4%、64.7%に相当する値であった。

さらに、119検体より抽出したDNAを用いて、サザンブロット解析を行った結果、図2-11に示した14検体で外来遺伝子の存在が確認された。しかし、ポジティブコントロールと同様4050bpのシグナルが認められたのはNos.9、10のみで、他の検体ではシグナルの分子量が一定ではなかった。これは環状のpSV2CATが任意の位置で切断された後他のpSV2CATと接続し、コンカテマーを形成したためではないかと考えられる。

考察

本研究において、DNA溶液中でパルスを加えた精子を卵に媒精することにより、遺伝子を個体に導入できることが示された。本法はマイクロインジェクション法に比べ、大量の個体を短時間に処理でき、特別な技術を必要としないといった利点があり、今後マイクロインジェクションにかわる外来遺伝子導入の新しい技法として、魚類のみならず、他の動物においても極めて有効な方法になると期待される。Inoueら(1990)はメダカの受精卵にエレクトロポレーション処理を行い、外来遺伝子を導入することに成功しているが、導入率は4%と本研究より低い値であった。さらに、チャンバー内に入れることのできる卵の数は限られるうえ、浮性卵や粘着卵、さらにはサケ科魚類の卵のように大型の卵にはパルス処理が困難である。しかし、精子へのエレクトロポレーション法はこのような問題もなく、極めて応用価値の高い方法と期待される。本研究で得られた遺伝子導入率は、マイクロインジェクション法と比べると低い値であったが、今後、電界強度、パルス回数、精子懸濁液の組成、DNA濃度など種々の条件を詳細に検討していくことにより改善できると期待される。

第3章 遺伝子導入魚における外来遺伝子の次世代への伝達

第2章では、マイクロインジェクション法およびエレクトロポレーション法により魚類個体に外来遺伝子を導入できることを示したが、マイクロインジェクション法は大量の卵を短期間に処理することができない上、熟練を要する。エレクトロポレーション法によりこれらの問題は解決できたものの、導入率が低いという問題が残っている。しかし、いずれの方法も処理個体の中から外来遺伝子導入個体をサザンブロット解析や polymerase chain reaction法（以下PCR法とする）等の繁雑で費用のかかる方法により、選別する必要がある。そこで、外来遺伝子を相同染色体上にホモに持つ個体を作成すれば、これらの個体と通常の個体を交配するだけで、得られたすべてのF1でヘテロに外来遺伝子を持つトランスジェニック種苗を、容易に作出できることができると期待される。しかし、遺伝子導入魚における外来遺伝子の次世代への伝達が報告された例は少なく、ゼブラフィッシュ (Stuartら, 1988; 1990; Culpら, 1991)、ニジマス (Guyomardら, 1988)、メダカ (Inoueら, 1990)、コイ (Zhangら, 1990)で報告されているのみである。そこで第3章では、全トランスジェニック種苗を作成するための基礎的研究として、マイクロインジェクション法によりコイ α -グロビン遺伝子No.4（以下C α G4とする）(Nobutaら, 1991)を導入したニジマスをモデルに用い、そのF1およびF2を作成し、C α G4の子孫への伝達様式を検討した。

第1節 遺伝子導入ニジマス精子における外来遺伝子の存在

本節では、まずC α G4をマイクロインジェクションしたニジマス卵より生じた遺伝子導入魚より精液を採取し、得られた精子における外来遺伝子の存在をサザンブロット解析およびPCR法により確認した。

材料と方法

採精

用いた親魚は第2章で開発した方法によりC α G4をマイクロインジェクションした個体を用いた (Yoshizakiら, 1991)。受精後10~12か月に電子タグ (Identification Devices Inc.) を腹腔内に挿入することにより個体識別をした後、各個体よりアブラビレを採取し、第2章 第2節と同様の方法で抽出したDNAを用いてサザンブロット解析を行い、C α G4の導入の有無を確認した。C α G4の導入が確認された個体のうち、排精している雄より採精し、以後の解析に用いた。

DNA解析

精子からのDNAの抽出は第2章 第2節の方法と同様の方法で行った。なお、PCR法に用いるDNAは透析後、エタノール沈殿を行ってから実験に供した。

PCR法には1 μ gのDNAを用い、プライマーには第1エキソンの上流部19merと第3エキソンの下流部19merを合成して用いた。なお、これらのプライマーに挟まれた領域の長さは0.73kbで、もし検体内にC α G4が存在すればPCR法により、この0.73kbの断片が増幅されるはずである (図3-1)。反応は1 μ Mの各プライマー、200 μ Mの各dNTP、2.5unitsのTaq DNAポリメラーゼ (Perkin Eimer Cetus Co., Ltd.) を含む100 μ lのPCR buffer中で行った。

これらのサンプルを94℃で60秒間処理することによりDNAを1本鎖にした後、55℃で60秒間処理し、プライマーをアニールさせた。続いてポリメラーゼによる相補鎖合成を72℃で90秒間行った。なおこの一連の反応をサーマルシークエンサー（岩城硝子 株）を用いて30サイクル行った（Saikiら, 1985）。反応終了後、TBE bufferを用いた0.7%アガロースゲルを担体とし、各反応液5 μ lずつを用い電気泳動を行い、増幅の有無を確認した。

サザンプロット解析は制限酵素未消化のDNAを用いて第2章第2節と同様の方法で行った。

結果

受精後10~12か月の164個体を解析した結果、約39%に相当する64個体にC α G4の存在が認められた。これらの個体のうち雄4尾（個体番号2F6C, 260D, 3151, 4141）が受精後約1年で成熟した（図3-2）。得られた精子は、運動形態はすべて+++で、運動精子の割合は90%以上、さらに運動時間もすべての区で1分以上と通常個体と同様の良好な運動能を有した。さらに、PCR法による解析の結果、4尾由来の精子のDNAを用いた区すべてでポジティブコントロールと同様、0.73kbの断片が増幅された。さらに、通常の子マウスDNAを用いたネガティブコントロールでは全く増幅が認められなかったため、明らかにC α G4がこれらの精子中に存在することが示唆された（図3-3）。次に、これらのC α G4が精子の染色体に組み込まれていることを確認するため、未消化DNAを用いたサザンプロット解析を行った。図3-4にその結果を示したが、4尾すべてのDNAを用いた区で染色体DNAと同じ高分子の位置にシグナルが認められ、これらの精子内でC α G4は染色体中に組み込まれて存在していることが示唆された。

考察

本研究で、ニジマス受精卵の1細胞期の細胞質に、外来遺伝子をマイクロインジェクションすることによって導入された外来遺伝子が、少なくとも一部の精子の中にも分配され、さらに外来遺伝子が精子の染色体中に組み込まれて存在していることが示唆された。また、運動能も良好であったため、通常の受精で大量の遺伝子導入魚が作出できると考えられた。

第2節 ニジマスに導入した外来遺伝子のF1およびF2への伝達

第1節で外来遺伝子が精子の染色体中に組み込まれ、かつそれらの精子は良好な運動能を示したことを確認したが、本節ではこれらの精子を通常のニジマスより搾出した卵に媒精することによりF1を作出した。その後、F1の受精率、初期生残率を調べるとともに、外来遺伝子の伝達率およびF1における外来遺伝子の存在様式を解析した。さらに、得られたF1のうち外来遺伝子の存在が確認され、かつ成熟した雄個体より精子を採取し、通常の卵に媒精してF2を作出した。次に、これらの個体の受精率、初期生残率および外来遺伝子の伝達率を解析した。

材料と方法

第1節で得た4尾のC α G4導入個体由来の精子を通常のニジマス3年魚より得られた卵に媒精し、その後10°Cで培養した。これらの卵の受精率、初期生残率を解析するとともに、第2章 第2節の方法により受精後30日の稚魚各区30尾全胚体からDNAを抽出した。このDNA1 μ g分をエタノール沈殿後、第1節の方法によりPCR法で解析した。さらに、C α G4の伝達が確認された個体については未消化のDNA、およびPst I消化DNAを用いて第2章 第2節と同様の方法でサザンブロット解析を行い、F1体内におけるC α G4の存在様式を解析した。

また、次世代への伝達を確認された系統については、受精後17か月のF1 20尾のアブラビレよりDNAを抽出し、第2章 第2節と同様の方法によりサザンブロット解析を行った。得られたF1のうちC α G4が存在した個体は、その後個体識別をして飼育し、F2作製の親魚に用いた。なお、F2の作製はF1作製と同様に行った。得られたF2に関しては、F1と同様に受精率、初期生残率、C α G4の伝達率を調べた。サザンブロット解析は受精後60日の個体の尾部筋肉より抽出した約25 μ gのDNAを用い、Pst I消化後に行った。

結果

第1節で解析した4尾由来の精子を、通常のニジマス卵に媒精した後の受精率、および初期生残率を表3-1に示した。受精率96.7~100%、発眼率84.7~91.7%、孵化率68.3~82.0%、浮上率51.3~71.9%と、どのステージでも比較的良好な生残率が得られた。さらに、浮上した稚魚は外観および行動は正常でその後も順調に成長した。次に、PCR法によりC α G4の伝達の有無を確認した結果、2F6C、260D、4141由来の各30尾より抽出した

DNAを用いた区では、全く増幅は認められず、C α Gの存在は確認できなかった。一方、3151由来の30尾のうち、7尾 (Nos. 1, 12, 16, 21, 24, 28, 29) においてポジティブコントロール (C α G4を鋳型に用いた) と同じ0.73kbの断片が増幅され、これらの7尾にC α G4が伝達したことが示された (図3-5)。

さらに、これらの7尾由来の未消化DNAを用いてサザンブロット解析を行ったところ、すべてのサンプルでシグナルは23.1kb以上の高分子の位置に認められ (図3-6)、C α G4はF1の細胞内で染色体中に組み込まれて存在していることが示唆された。

次に、C α G4内に1ヵ所しか切断点の存在しないPst Iによりこれら7検体のDNAを消化後、サザンブロット解析を行った (図3-7)。なお、図中のFは雄親である3151のDNAを用いた区である。C α G4がhead-to-tailのコンカテマーを形成した場合、Pst I消化により2.2kbの断片が、さらにhead-to-headおよびtail-to-tailのコンカテマーを形成した場合、3.1kbおよび1.4kbの断片が生じる (図3-7下)。図3-7上に示したように、16には3.1、2.2、1.4kbすべてのシグナルが認められ、C α G4がhead-to-head、head-to-tail、tail-to-tailの3種類のコンカテマーを形成していることが示唆された。しかし、他のサンプルでは3.1kbと1.4kbシグナルしか認められず、head-to-tailとtail-to-tailの2種のコンカテマーを形成していると推測された。さらに、16と他の個体では、明らかにシグナルの強さも異なっていた。

また、受精後17か月の3151のF1のアブラビレより抽出したDNAを用いて行ったサザンブロット解析の結果、20尾中7尾にC α G4の伝達を確認された。さらに、これらの内、head-to-tailおよびtail-to-tailのコンカテマーを形成したC α G4を持つ雄1尾が受精後約2年で排精したので、この精子を通常のニジマス卵に媒精し、F2を作出した。表3-2にこれらF2の受精率、および初期生残率をまとめた。Cは通常のニジマスの精子を用いた対照区だが、F2もこの対照区とほぼ同様の良好な生残率を示した。

これらのF2のDNAを用いて行ったサザンブロット解析の結果、13検体中6検体 (約46%) で2.2kbと1.4kbのシグナルが認められ (図3-8)、C α G4がF2にも伝達し、F2細胞内でhead-to-tailおよびtail-to-tailのコンカテマーを形成していることが判明した。

考察

本研究で、ニジマス受精卵の1細胞期の細胞質にマイクロインジェクションされた外来遺伝子は、通常の交配により一部の次世代へ伝達し、さらにF2へは約50%の確率で伝達することが示された。通常、外来遺伝子が第1卵割前に宿主の染色体に組み込まれた場合、それらは細胞分裂にともなうて、宿主染色体とともに複製後、すべての細胞に分配されるはずである。これらの細胞に存在する外来遺伝子は、通常、相同染色体の片側にのみ組み込まれているため、減数分裂により約50%の配偶子に外来遺伝子が伝達し、生じたF1の約50%に外来遺伝子は伝達すると推測される。しかし、4尾の親魚のうち、3尾の親魚の精子には外来遺伝子が存在していたものの、F1では外来遺伝子を検出できなかった。これは、これら3尾の精液に含まれていた精子のうち、外来遺伝子を持つ精子は極めて小数で、他のほとんどの精子は外来遺伝子を持たなかったため、今回調べたF1各30尾中では外来遺伝子を検出できなかったのではないかと考えられる。このような外来遺伝子のモザイク状の組み込みは、1細胞期にマイクロインジェクションされた外来遺伝子が、すぐには宿主の染色体中に組み込まれずに、染色体外に遊離した状態で存在し、何度かの卵割の後に一部の割球の染色体に組み込まれたために起きたのではないかと推測される（図3-9）。このように、一部の遺伝子導入個体の次世代で外来遺伝子が検出されなかったという報告はゼブラフィッシュ（Stuartら, 1988; Culpら, 1991）でも報告されており、外来遺伝子が組み込まれた染色体を持つ細胞が極端に少なかったためこのような現象はもたらされたのではないかと述べている。

3151のF1には外来遺伝子が伝達したが、その伝達率は23.3%と明らかに50%より低い値であった。したがって、3151体内においても外来遺伝子を持つ細胞と持たない細胞が混在しており、2F6C、260D、4141と同様に、マイクロインジェクションされた外来遺伝子は、数回の卵割の後で染色体に組み込まれたと考えられた。しかし、その組み込みの時期は他の系統より速い時期であったため、外来遺伝子を持つ細胞の頻度が比較的高く、次世代への伝達率も高かったと考えられる。また、3151のF1には外来遺伝子が

head-to-tailおよびtail-to-tailのコンカテマーを形成して組み込まれている個体（図3-7, No.16以外）とhead-to-head、head-to-tailおよびtail-to-tailのコンカテマーを形成している個体（図3-7, No.16）の2種類が存在した。これは先程と同様、1細胞期にマイクロインジェクションされた外来遺伝子が数回の卵割の後に、Nos.1、12、21、24、28、29が生じた卵に受精した精子の起源である割球の染色体に組み込まれ、さらに何度かの卵割の後にNo.16の様なhead-to-head、head-to-tail、tail-to-tailのコンカテマーを形成した状態で別の割球（No.16が生じた卵に受精した精子の起源である割球）の染色体に組み込まれたと推測される（図3-10）。このような外来遺伝子の低頻度での次世代への伝達は、ゼブラフィッシュ（Stuartら, 1988; Culpら, 1991）、ニジマス（Guyomardら, 1989）、コイ（Zhangら, 1990）、Xenopus（Etkinら, 1984）でも観察されている。また1細胞期に外来遺伝子が染色体に組み込まれ、理論通りに50%のF1に外来遺伝子が伝達したという報告は魚類では存在しない。しかし、遺伝子導入マウスにおいてはほとんどが1細胞期の染色体に外来遺伝子は組み込まれ、モザイク状に組み込まれる例は稀である（Palmiter and Brinster, 1986）。これらの違いは、魚類やXenopusでは外来遺伝子を受精卵の細胞質にマイクロインジェクションするのに対し、マウスでは受精卵の雄性前核にマイクロインジェクションするため、マウスの方が外来遺伝子を早く染色体に取り込みやすいという解釈もできる。しかし、Ozatoら（1986）はメダカの卵母細胞の卵核胞に外来遺伝子をマイクロインジェクションし、その後in situ ハイブリダイゼーション法により外来遺伝子を検出した結果、細胞レベルでモザイク状に外来遺伝子が分布していたと報告している。また、第2章 第3節でニジマス受精卵の細胞質にマイクロインジェクションされた外来遺伝子が初期発生中に宿主細胞内で増幅したと述べたが、このような現象は線虫（Stinchcombら, 1985）、ウニ（McMahonら, 1985）、Xenopus（Rusconiら, 1981）、ゼブラフィッシュ（Stuartら, 1988）、メダカ（Chong and Vielkind, 1989）においても報告されている。一方、マウスにおいてはそのような増幅は極めて稀であると報告されている（Chenら, 1986, Wirakら, 1985）。このような点から、マウスの1細胞期の染色

体へ外来遺伝子の組み込みが起きなかった場合、卵割に伴い細胞内における外来遺伝子の濃度が急激に減少すると予測される。したがって、1細胞期に組み込みが起きなかった個体では、それ以後に外来遺伝子が染色体へ組み込まれる確率は極めて低いと考えられる。逆に魚類では初期発生の過程において外来遺伝子が一定の割合で増幅されるため、卵割による細胞内の外来遺伝子濃度の減少がマウスに比べると遅く、比較的高濃度に保たれる。したがって、発生がしばらく進んだ後も外来遺伝子が染色体に組み込まれる確率が高いのではないかと推測される。しかし、外来遺伝子が魚類の1細胞期の染色体に組み込まれにくい理由は全く説明されておらず、今後、外来遺伝子の宿主への組み込みの機構を理解することにより、解決されるのではないかと期待される。

F2への外来遺伝子の伝達率は約50%であったが、同様の結果はゼブラフィッシュ (Culpら, 1991)、メダカ (Inoueら, 1990) においても観察されており、魚類においても一度宿主の染色体に組み込まれた外来遺伝子は、メンデルの法則と同様の遺伝様式を示すと考えられた。

このように、一度宿主の染色体に組み込まれた外来遺伝子は安定して次世代へ伝達したことから、宿主染色体の同じ位置に外来遺伝子を持つF1を両親魚としてF2を作出すれば、25%の確率で外来遺伝子をホモにもつ個体が得られることが期待される。さらに、このホモ個体を親魚に用いれば通常の個体と交配するのみで、全個体に外来遺伝子をヘテロに持つ種苗を容易に作出できると考えられる。さらに、人為雌性発生などにより外来遺伝子をホモ化すれば、より早く同様の親魚を作出できると考えられる。

第4章 遺伝子導入魚における外来遺伝子の発現

遺伝子導入魚に有用形質を付加するためには導入した外来遺伝子が転写、翻訳され、生理活性を持った目的のタンパク質を個体内で産生させる必要がある。しかし、魚類の遺伝子発現機構はほとんど解明されていない上、クローニングされている遺伝子も多くはない。通常、遺伝子の発現にはプロモーター、エンハンサーなどを含む遺伝子発現調節領域の機能が重要であるが、魚類においてこのような研究はほとんど行われておらず、ニジマスのメタロチオネインB(Zafarullahら, 1988,1989)、ocean pout, Wolffish, winter flounderおよび sea ravenの抗凍結タンパク質(Gongら, 1991)およびコイの β -アクチン(Liu, 1990b)のcis-acting DNA配列の同定が試みられているのみである。また遺伝子導入魚における外来遺伝子発現の報告も多くはなく、メダカ(Ozatoら, 1986; Inoueら, 1989; Chong and Vielkind, 1989; Tamiyaら,1990; Winklerら, 1991)、大西洋サケ(McEvoyら, 1988; Rokkonesら, 1989)、ニジマス(Rokkonesら, 1989)、コイ(Zhangら, 1990)、ゼブラフィッシュ(Stuartら, 1990; Liuら,1990a)などで報告されているのみである。このように、外来遺伝子の発現の研究は主に実験動物としてのメダカやゼブラフィッシュにおいて行われており、水産上有用種での研究は余り進んでいない。そこで、本章ではニジマスにおける有効な遺伝子発現調節配列を開発するための基礎的研究として、ニジマスに導入したクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(以下CAT)遺伝子の発現について検討した。また前述の報告のうちメダカ(Ozatoら, 1986; Inoueら, 1989; Chong and Vielkind, 1989; Tamiyaら, 1990; Winklerら, 1991)、大西洋サケ、ニジマス(Rokkonesら, 1989)、ゼブラフィッシュ(Liuら, 1990a)における報告は外来遺伝子の発現を孵化以前あるいは孵化直後にのみ検出しており、成体における発現はゼブラフィッシュ(Stuartら, 1990)およびコイ(Zhangら, 1990)で報告されているのみである。さらに第3章で遺伝子導入魚を親魚に用いて次世代を作出することの有効性を示したが、次世代に伝達した外来遺伝子の発現はゼブラフィッシュで1例報告されているのみである(Stuartら, 1990)。しかし、

育種あるいは実験動物として遺伝子導入魚を利用することを考えると初期胚のみでなく成体および次世代においても安定して外来遺伝子を発現させ得るシステムの開発が必要不可欠である。そこで、これらの問題を解決し、あらゆる発生段階で安定して外来遺伝子を発現させ得るシステムを開発するため、まず第1節でニジマスにRSVCAT (図2-1) およびpSV2CAT (Gormanら, 1982a) を導入し、その初期胚における発現量の変化を解析した。続いて、第2節で受精後70日の稚魚におけるRSVCATの発現を、さらに第3節で次世代におけるRSVCATの発現について解析した。

なお、ラウス肉腫ウイルス (以下RSV) のロングターミナルリピート (以下LTR) は、ニワトリ、および種々の哺乳類 (Gormanら, 1982b)、Xiphophorus、コイ (Friedenreich and Scharf, 1990) およびニジマス (Inoueら, 1990) の培養細胞で強いプロモーター活性が認められており、シミアンウイルス40の発現調節領域は哺乳類の種々の組織由来の培養細胞中でプロモーター活性が認められている (Gormanら, 1982a)。また、CATとはクロラムフェニコールをアセチル化する酵素で、この遺伝子を細胞に導入後、細胞中のCAT活性を測定することにより容易に外来遺伝子の発現量を定量できる。さらに、この酵素は真核生物には存在しないため、哺乳類では幅広く用いられているレポーター遺伝子である (村松ら, 1988e)。

最後に、第4節で種々のプロモーター (狭義にはRNAポリメラーゼの結合領域を意味するが、本節では遺伝子上流域において発現促進領域として機能するDNA配列のことを示すこととする) 活性をニジマス胚において測定し、ニジマスにおける有効なプロモーターの探索を行った。

第1節 ニジマスに導入したCAT遺伝子の初期胚における発現

魚類に導入された外来遺伝子の発現は、孵化以前の胚における一過性の発現の報告がほとんどである。そこで、本節では外来遺伝子の初期胚における発現量の変動を明らかにするため、ニジマスにRSVCATおよびpSV2CATを導入後、初期発生過程におけるCAT活性の変化を測定し、第2章 第3節で解析した外来遺伝子のニジマス初期胚における挙動と併せて考察した。

材料と方法

マイクロインジェクションとサンプリング

Pvu II、Bam HIの2重消化によりベクター配列を除去したpSV2CAT (図2-9)、およびRSVCAT (図2-3) を 10^7 コピーずつ、第2章 第1節と同様の方法でニジマス受精卵の1細胞期の細胞質にマイクロインジェクションした。その後 10°C で培養し、受精後20~22時間(32細胞期)、30~32時間(桑実胚期)、3日(胞胚期)、5日(囊胚期)、7日(神経胚期)、12日(12日胚期)、20日(発眼)、32日(孵化)に各10粒ずつサンプリングし、卵黄を除去した後、各10粒をまとめてタンパク質の抽出に用いた。

タンパク質の抽出

各サンプルにニジマス用等調液を加え、良く攪拌した後、3000rpmで10分間遠心分離した。その後、上清を除去し、卵黄内容物をできるだけ取り除いた。その後0.25M Tris(pH 7.5)を $150\mu\text{l}$ ずつ加え、ポリプロピレン製のマイクロホモジナイザーにより組織を磨碎した。さらに、凍結融解法(Ausubelら, 1987)により細胞内タンパク質を抽出し、その濃度をProtein assay kit(Bio-Rad Co.,Ltd.)により測定した。なお、以後のCAT

assayには400 μ gのタンパク質を含む細胞抽出液を用いた。

CAT assay

細胞抽出液を0.25M Tris (pH7.5) で150 μ lに調整し、これに4 μ lの¹⁴C-クロラムフェニコール (925KBq/ml) (Amersham Co., Ltd.)、20 μ lの4mMアセチルコエンザイムA (Sigma Inc.) を加え、37°Cで2時間保温した。その後、再度20 μ lのアセチルコエンザイムAを加え、37°Cで1晩保温した。続いて、反応液中のアセチル化クロラムフェニコールおよびクロラムフェニコールを600 μ lの酢酸エチルで抽出後、減圧下で乾燥させた。これを再度15 μ lの酢酸エチルで溶解し、クロロホルム-メタノール (95:5) を用い、薄層クロマトグラフィーで展開した。その後、イメージングアナライザー (β -gen Co., Ltd.) により、各スポットに含まれるアイソトープ量を定量し、CAT活性を求めた。

結果

RSVCAT導入区での発現は、桑実胚まで全く検出されなかったが、胞胚期において転換率89%の高レベルの発現が認められた。その後、囊胚期で転換率92%、神経胚期で89%、12日胚で76%、発眼期で87%と高レベルの発現量で推移したが、孵化稚魚では転換率21%と減少した (図4-1)。一方、pSV2CATを導入した区でもRSVCAT導入区と同様、桑実胚期までは全く発現は認められなかった。さらに、胞胚期でも転換率は0.3%、囊胚期で2.6%、神経胚期で1.2%、12日胚期で3.9%、発眼期で2.6%、孵化稚魚で1.6%とRSVCATと比べると低い値で推移した。(図4-1)。

考察

図4-1に示したように、RSVCAT、pSV2CATともに桑実胚期以前では全く発現しなかった。Chong and Vielkind (1989)はメダカにおいても胞胚前期以前では、外来遺伝子が全く発現しなかったと報告している。さらに、Newport and Kirschner (1982a)はXenopusの内在性の遺伝子が胞胚中期になって初めて転写を開始することを示し、これをmidblastula transition (以下MBTとする)と呼んだ。さらに、外来遺伝子をXenopusに導入した際も、MBT以降にしか発現しないことを報告している (Newport and Kirschner, 1982b)。この現象は受精卵中に遺伝子の発現を阻害するDNA結合因子が存在し、MBT以前ではこの因子が全てのDNAの発現を抑制していると考えられている。しかし、卵割によりDNAの量が急激に増幅され、逆にDNA結合因子は希釈されるため、MBTにはその因子が結合しきれないDNAが現われ、その後その割合も増すため、発現が認められるようになると説明している (Newport and Kirschner, 1982b)。したがって、このような現象が魚類胚においても起きている可能性もあると推測される。また、花岡ら(1992)は、広い範囲の動物組織で発現する、ウイルス遺伝子のプロモーターは、未分化な細胞では活性が低いと述べている。したがって、このような理由で、桑実胚期以前の未分化な状態の細胞で発現が低かった可能性もあると思われる。

また、本実験では調べたすべての発生段階においてpSV2CATよりもRSVCATのほうが発現量が多かったが、コイ上皮性EPC細胞においてもRSVの遺伝子発現調節領域の方が、pSV2CATのそれよりも7倍近い活性をもっていることが示されており (Liuら, 1990a)、RSVの遺伝子発現調節領域が魚類においても有効であると考えられた。

さらに、本研究で示した外来遺伝子の発現量の変化が、導入された外来遺伝子の量により支配されているのか、あるいは発生段階ごとの発現制御を受けた結果なのかを明らかにするため、第2章 第3節で解析したRSVCAT、pSV2CAT導入ニジマス卵における、外来遺伝子量の変化を今回得られた結果と併せて示した (図4-2, 3)。その結果RSVCATでは遺伝子量が12日胚まで

減少を続けるのに対し、発現量は胞胚期から発眼期の間で高レベルを保った。また、pSV2CATもDNA量が受精後12日胚期まで減少を続けるのに対し、発現量は12日胚まで増加を続け、その後減少した。このように、外来遺伝子の宿主細胞内における量とその発現量の相関はほとんど認められず、RSVCATおよびpSV2CATのニジマス初期胚における発現はそれぞれの発生段階ごとくに制御を受けていると推測された。また、第2章 第3節で12日胚以前に減少する外来遺伝子は、宿主の染色体に組み込まれない可能性が高いことを述べたが、これらの時期の発現量は染色体外の外来遺伝子が産生したタンパク質も含めた値であると考えられ、今後外来遺伝子の存在状態とその発現の関係も解析する必要があると思われる。

第2節 ニジマスに導入したCAT遺伝子の稚魚における発現

外来遺伝子が宿主の染色体に組み込まれた状態で発現することは、遺伝子導入魚を育種や実験動物として利用していくうえで極めて重要なことであると考えられる。すなわち、宿主の染色体外に存在している外来遺伝子がある時期で発現しても外来遺伝子が崩壊していくのにつれ、発現量も減少していくため目的の形質を宿主に安定して付加することができない。しかし、外来遺伝子が宿主の染色体中に組み込まれて発現したという報告はゼブラフィッシュ (Stuartら, 1990) およびコイ (Zhangら, 1990) で1例ずつあるのみで、サケ科魚類では全く報告がない。そこで、本節ではRSVCATをマイクロインジェクションしたニジマスを用い、受精後70日目の発現を、染色体中への組み込みとともに解析した。

材料と方法

10^7 コピーのRSVCAT (図2-3) を第2章 第1節で述べた方法により、ニジマス受精卵1細胞期の細胞質にマイクロインジェクションした。これらの卵を 10°C で飼育し、受精後70日に10尾をサンプリングした。各個体を正中線に沿って左右に分け、左半分全体を用いてタンパク質の抽出を行った (なお、右半分は、第2章 第2節においてDNAの解析に用いた)。タンパク質の抽出およびCAT assayは、前節と同様の方法により行った。

結果

図4-4にCAT assayの結果を示した。Pは組織抽出液の代わりにクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼを2.8units加えたポジティブコントロールで、最下段のクロラムフェニコールのスポットに加え、移動度の大きい2つのアセチル化されたクロラムフェニコールのスポットが確認された。一方、Nは通常のニジマスの組織抽出液を用いたネガティブコントロールでアセチル化されたクロラムフェニコールのスポットは全く認められていない。さらに、No.1~No.10のサンプル中ではNo.8を除いてすべての個体でアセチル化されたクロラムフェニコールのスポットが確認され、RSVCATがこれらの個体で発現していることが示された。

考察

本研究で、受精後70日目のニジマス稚魚10検体中9検体でRSVCATの発現が確認された。これらのうち、1~6の個体ではRSVCATが宿主の染色体中に組み込まれて存在していることを既に確認しているが（第2章 第2節）、No.7~10の個体ではRSVCATの存在は確認できなかった。したがって、少なくとも1~6の6検体では、RSVCATが宿主の染色体中に組み込まれた状態で発現していることが明らかになった。サケ科魚類での外来遺伝子の発現は大西洋サケ（McEvoyら, 1988; Rokkonesら, 1989）、およびニジマス（Rokkonesら, 1989; Inoueら, 1991）において報告されているが、McEvoyら（1988）は外来遺伝子の存在についてはドットプロットハイブリダイゼーションによって確認しているのみで、宿主染色体への組み込みは確認していない。さらに、Inoueら（1990）は7日胚と孵化稚魚において外来遺伝子の発現を確認しているが宿主染色体への外来遺伝子の組み込みは検討してい

ない。また、Rokkonesら(1989)はヒト成長ホルモン遺伝子を大西洋サケおよびニジマスに導入し、4日胚においてのみ成長ホルモンを検出しているが、この時期の個体では外来遺伝子の宿主染色体への組み込みを検討していない。以上のように、これらの報告は宿主染色体外の外来遺伝子の一過性の発現を検出している可能性が極めて大きいと考えられる。魚類において染色体中に組み込まれた外来遺伝子が発現したという報告はゼブラフィッシュにpUSVCAT, pSVeRSVCATを導入した例(Stuartら,1990)と、コイにpRSVrtGHcDNAを導入した例(Zhangら,1990)のみであり、これらの報告で用いられた遺伝子は全てRSVのLTR配列が用いられている。本研究では、サケ科魚類では初めて外来遺伝子の宿主染色体中での発現を示したが、今回用いたRSVのLTRは魚類においても高等動物と同様、外来遺伝子のプロモーターとして極めて有効であることが判明した。

第3節 ニジマスに導入したCAT遺伝子の次世代における発現

個体に導入した外来遺伝子の一部が次世代へ伝達することは、既に第3章で述べたが、遺伝子導入魚の子孫において有用形質を維持し続けるためには、外来遺伝子が次世代においても安定して発現する必要がある。そこで、本節ではRSVCATを導入したニジマスの次世代におけるRSVCATの発現の有無を検討した。

材料と方法

前節と同様の方法でRSVCATをマイクロインジェクションしたニジマスを10℃で飼育し、満1年で成熟した20尾の雄を親魚に用いた。卵は第3章と同様、通常のニジマス3年魚より採取し、媒精は等調洗卵法により行った。得られたF1を受精後60日目に各親魚につき20尾ずつサンプリングし、第4章 第1節と同様の方法でタンパク質を抽出し、CAT assayを行った。

結果

CAT assayを行った400検体のうち、親魚No.16と親魚No.18由来のF1各1尾ずつでRSVCATの発現が認められた。図4-5に発現の認められた2検体の結果を示したが、通常のニジマスより抽出したタンパク質を用いた各ネガティブコントロール(N)では全くアセチル化されたクロラムフェニコールは検出できなかったのに対し、左側に示したF1由来のタンパク質を用いた区では明らかにポジティブコントロールと同様のアセチル化されたクロラムフェニコールが確認でき、RSVCATが発現していることが示された。

考察

本研究で、ニジマスに導入したRSVCATがそのF1にも伝達し、さらにF1体内で発現したことが示された。以上の結果から、RSVのLTRをプロモーター、エンハンサーとし、SV40のスプライシングシグナルおよびポリA付加シグナルをターミネーターに用いたシステムがニジマス体内で安定して外来遺伝子を発現させるために有効なシステムであることが示唆された。また、RSVのLTRはコイ(Zhangら, 1990)、ゼブラフィッシュ(Stuartら, 1990)においても、次世代で機能しているため、幅広い種類の魚類において有効な発現調節領域なのではないかと考えられる。また、400尾のF1のうち、発現が認められたのはわずか2尾であったが、第3章 第2節では4尾の親魚中1尾由来のF1では、その23%の個体に外来遺伝子が伝達した。したがって、これら400尾の中には外来遺伝子が伝達しているにもかかわらず発現していない個体もかなり含まれるのではないかと推測される。Gordon and Ruddle(1985)はマウス個体に導入された外来遺伝子は、宿主の染色体に組み込まれた位置によりその発現量が異なると述べている。したがって、外

来遺伝子の発現が抑制されるような染色体上の位置に組み込まれた外来遺伝子は、発現しないこともあると考えられる。逆に、発現が認められた2検体で外来遺伝子の発現を促進するような染色体上の位置に組み込まれたと考えることもできるが、今後詳細に検討する必要があるだろう。

第4節 ニジマスにおける外来遺伝子発現のための有用プロモーター の開発

魚類において有効なプロモーターの開発は極めて遅れているのが現状であり、現在までのところ、遺伝子導入魚において活性が認められているプロモーターは、第4章 第1～3節で述べたSV40、RSVのほかニワトリ δ -クリスタリン (Ozatoら, 1986; Inoueら, 1989)、マウスメタロチオネインI (McEvoyら, 1988; Rokkonesら, 1989)、ヒト熱ショックタンパク70、コイ β -アクチン (Liuら, 1990)、ヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ、ヒトサイトメガロウイルス、ヒトメタロチオネインII A、*Xiphophorus*の金属応答領域 (Winklerら, 1991)、が報告されている。しかしこれらのプロモーターのほとんどはメダカとゼブラフィッシュを用いて解析された物で、水産上有用種での解析例は非常に少ない。そこで本研究ではニジマスにおけるRSV、SV40、pSR α 、およびニジマスのメタロチオネインB遺伝子 (以下MTとする) のプロモーター領域をCAT遺伝子に接続し、その発現量を定量化することにより、これらのプロモーター活性を比較した。

材料と方法

RSVCATは第2章 第1節で作製したDNA断片を用い、SV40由来のプロモーターを用いた物としては、Gormanら (1982a) により作製されたpSV2CATを用いた。またTakebeら (1988) によって作製された、SV40の初期プロモーターとヒトT細胞白血病ウイルスIのLTRを接続したSR α プロモーターをCAT遺伝子の上流に接続したpSR α CATも用いた。さらに、ニジマスMTのプロモーターは、Zafarullah (1988) により報告された塩基配列を元にPCR法により増幅したDNA断片を用いた。すなわち図4-6に示したように-182~-200領域と

+48~+67領域をプライマーとして第3章 第1節と同様の方法でPCR法による増幅を行った。その後増幅された断片をFba I (宝酒造株式会社) とHind III (東洋紡績株式会社) による2重消化後、Bam HI (東洋紡績株式会社) およびHind IIIにより2重消化したpUC119に、村松ら(1988b)の方法によりクローニングした。続いてこのクローンをSma I (東洋紡績株式会社) およびHind IIIで2重消化後、第2章 第1節と同様の方法でMT断片のみを単離した。また、RSVCATのRSV領域をNru IおよびHind III消化により同様の方法で取り除き、そこに前述のMT断片をクローニングした。なお、目的のクローンの選択には第2章 第1節と同様の方法でアルカリ法(村松ら, 1988c)後、Hind IIIでプラスミドを消化し、目的の分子量の物を選択した。さらに、第2章 第1節の方法で各プラスミドを大量調整後、pSR α CATはBam HIで直鎖化し、MTCATはSac IとPst Iで2重消化によりベクター配列を除去した。その後、すべてのDNAを 10^7 コピー/2 μ lとなるように10mM Tris(pH8.0) 0.1mM EDTAに溶解し、マイクロインジェクションに用いた。

マイクロインジェクションは第2章 第1節と同様の方法で行い、ニジマス受精卵の1細胞期の細胞質に、 10^7 コピーの外来遺伝子をマイクロインジェクションした。受精後15日、30日に各区10尾ずつサンプリングし、第4章 第1節と同様の方法で卵黄を除去後、タンパク質の抽出およびCAT assayを行った。なお、MTCAT導入区では、サンプリングの直前に100 μ MのZnCl₂またはMnCl₂溶液に卵を6時間浸漬した区も設けた。

結果

各区のCAT活性を図4-7に示したが、15日胚ではMTCAT導入区で転換率0.04%、pSV2CATが0.05%とほとんど発現していなかったのに対し、RSVCAT導入区では20.79%、pSR α CAT導入区では39.31%と高い発現を示した。さらに、受精後30日胚では、MTCAT導入区での転換率が0.28%、pSV2CAT導入区では0.09%と15日胚と同様に低レベルの発現しか見られなかったが、RSVCAT導入区で3.02%、pSR α CAT導入区では4.19%と比較的高い値が得られた。このように、pSR α CATは両発生段階において最も発現量が多かった。なお、MTCAT導入区では、亜鉛、銅による誘導にも反応しなかった。

考察

本研究では、高等動物において効果が報告されているウイルス由来の3種のプロモーターのニジマスにおける活性を比較したが、これらの中ではpSR α が最も活性が高く、次いでRSVの活性が高かった。pSR α のプロモーター活性を魚類細胞または魚類個体内で検討した報告は今まで全く存在しないが、今回の研究で、従来魚類で有効なプロモーターと考えられていたRSVより強い活性が認められた点から、かなり効果のあるプロモーターと考えられる。今後RSVと同様、ニジマス個体の種々の発生段階および種々の条件下での発現量の変化を解析し、その機能を明らかにする必要があると思われる。

またMTのプロモーター活性は非常に弱かった。本研究ではPCR法で増幅した断片を用いたが、Taqポリメラーゼは約400塩基に1か所2本鎖合成を間違えると報告されているため(Saiki, 1989)、このような人為的な変

異がプロモーター内に導入されてしまい、本来のプロモーター活性を示さなかつた可能性もあると考えられる。今後より長い上流域を持つクローンをクローニングし、塩基配列を確認した後に、同様の実験を行いそのプロモーター活性を解析する必要があるだろう。

第5章 魚類グロビン遺伝子発現調節機構の解明

第4章では高等動物を宿主とするウイルス由来のプロモーターが、ニジマス体内で外来遺伝子発現促進活性を持つことを示したが、より高レベルの発現、および時期、組織特異的発現を期待した場合、魚類自身の遺伝子あるいは魚類を宿主とするウイルス遺伝子由来のプロモーターを利用することが望まれる。そのためには、まずこれらのプロモーターの作用機序を明らかにする必要があると思われる。近年、コイ β -アクチンのプロモーターが外来遺伝子の発現を強く促進することがゼブラフィッシュ (Liuら, 1990)、ノーザンパイク (Grossら, 1992)、ティラピア (Rahmanら, 1992) で明らかになっている。さらに、ocean pout, wolffish, winter flounder, sea ravenの抗凍結タンパク質のプロモーターがメダカで (Gongら, 1991)、ocean pout の抗凍結タンパク質のプロモーターが大西洋サケで (Gongら, 1992) 強い発現促進活性を持つことが認められている。このように魚類の遺伝子由来のプロモーター配列が外来遺伝子を効果的に発現させ得ることが示されつつあるが、組織特異性、および時期特異性に関する報告は見当たらない。そこで本章では魚類のヘモグロビン遺伝子をモデルにし、その発現の機構を明らかにするための基礎的研究を行った。

ヘモグロビンは脊椎動物では赤血球および造血組織で特異的に存在し、哺乳類、ニワトリ、両性類等では各発生段階ごとに異なったグロビン鎖より構成されるヘモグロビン分子が産生されていることが知られている (帯刀と井川, 1981)。さらに、魚類においてもシロザケ (Hashimoto and Matsuura, 1960)、ギンザケ、ベニザケ (Vanstoneら, 1964)、大西洋サケ (Westman, 1970; Hashimotoら, 1960)、ブラウントラウト (Hashimotoら, 1960)、カワマス、ニジマス (Yamanakaら, 1967)、ヒラメ (Miwa and Inui, 1991) で成長にともなってグロビンタンパクの電気泳動像が変化することが報告されている。さらにIuchi (1973) はニジマスにおいて孵化稚魚と成魚ではヘモグロビンのアミノ酸組成および酸素結合能が異なることを報告している。このようにグロビン遺伝子は組織および時期特異的に発現しており、魚類の遺伝子発現調節機構を解明する上で良い材料にな

ると考えられる。

そこで、第1節では、コイ α -グロビン遺伝子をニジマスに導入し、その発現の有無を検討し、さらに、第2節ではニジマス初期胚におけるコイ α -グロビン遺伝子の5'上流域のプロモーター活性を調べ、その組織および時期特異性を検討した。また、第3節では魚類グロビン遺伝子クローニングのための基礎研究としてコイ成体で発現している β -グロビンcDNAのクローニングを行った。

第1節 ニジマスに導入したコイ α -グロビン遺伝子の発現

魚類個体に魚類自身の遺伝子を導入した報告は、大西洋サケにwinter flounderの抗凍結タンパク質の遺伝子を導入した報告のみである (Fletcherら, 1988)。しかし、魚類体内で外来遺伝子の発現が正確に制御され、然るべく時期および組織で発現させるためには魚類自身の遺伝子を用いる必要があると考えられる。さらに、コイのように低酸素環境に強い魚種のヘモグロビンは、酸素解離曲線の立ち上がりが急で、低い酸素分圧で一定の酸素飽和度に達するのに対し、ニジマスのように酸素の豊富な環境に生息する魚種のヘモグロビンは、酸素解離曲線の立ち上がりがなだらかで一定の酸素飽和度に達するのに高い酸素分圧を要する (板沢, 1977)。したがって、コイのヘモグロビンをニジマス体内で産生させれば、コイの低酸素耐性をニジマスに導入することも可能になると期待される。そこで、本節ではこれらの研究の基礎的知見を得るため、コイ α -グロビン遺伝子をニジマスに導入し、宿主血球中でのコイ α -グロビン遺伝子の発現をノーザンブロット解析により調べた。

材料と方法

マイクロインジェクションとサンプリング

コイ α -グロビン遺伝子4 (以下C α G4) (Nobutaら, 1992) は、Bam HI、Hind IIIによる2重消化後、第2章 第1節と同様の方法により、約2.2kbの断片を単離した。この断片は約1.1kbの5'上流域、2つのイントロンおよび約300bpの3'下流域を含む断片である。またコイ α -グロビン遺伝子5、6、7 (以下各々C α G5、C α G6、C α G7とした。) もそれぞれEco RI、Hind IIIによる2重消化後、同様に約1.8kbの断片を単離した。これらの断片には約260bpの5'上流域と2つのイントロン、さらに約550bpの下流域を持つ断片である (図5-1)。これらのDNA断片を第2章 第1節と同様の方法により、 10^7 コピーずつニジマス受精卵の細胞質にマイクロインジェクションした。その後10°Cで飼育し、受精後20か月に各区15個体の全血球よりRNAを抽出した。

RNAの単離

血液80 μ lにニジマス用等調液を約1ml加え、良く攪拌後、3000rpmで15分間、遠心分離することにより血球の沈殿を得た。その後250 μ lのRNA extraction buffer中に再懸濁した後、等量のProteinase digestion bufferを加え、直ちにボルテックスミキサーで激しく混和した。その後、サンプルの粘性が無くなるまで25Gのシリンジにサンプルを出し入れし、DNAを物理的に分解した。続いてproteinase Kを終濃度200 μ g/mlになるよう加え37°Cで30分間処理し、タンパク質を分解した。その後フェノール-クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により核酸を回収した。続いてDNase I (宝酒造株式会社)を終濃度200 μ g/mlとなるよう加え37°Cで1時間処理し、DNAを分解した。さらに、再度フェノール-クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりRNAを回収後、吸光度を測定し濃度を算出した。

ノーザンブロット解析

20 μ gの全RNAを4.5 μ lのTE (pH7.6) に溶解後、5 \times RNA用泳動緩衝液2.0

μ l、ホルムアルデヒド 3.5μ l、ホルムアミド 10.0μ lをそれぞれ加え、 55°C で15分間処理し、RNAの2次構造を除去した。その後1.0%ホルムアルデヒドゲルを用い電気泳動を行い、ゲルを水洗後、 $20\times$ SSCに20分間浸し、キャピラリー法（村松ら,1988f）によりRNAをナイロン膜（ハイボンドN,アマシャム株）にプロットした。ハイブリダイゼーションは勝木ら（1987c）の方法により行った。プローブにはコイ α -グロビンcDNA（Takeshitaら,1984）全長を用い、メンブレンの洗浄は $2\times$ SSPEで室温にて15分、 $1\times$ SSPE、0.5%SDSで 65°C にて15分、さらに $0.1\times$ SSPE、0.5%SDSで 65°C にて15分を行い、その後オートラジオグラフィーを2日間行った。

結果と考察

図5-2に示したように、コイ血球RNA $1\mu\text{g}$ 用いた区（P）では強いシグナルが認められたのに対し、C α G導入個体60尾（各区15尾）の血球由来のRNAを用いた区では、ネガティブコントロールと同様の弱いシグナルしか認められなかった。これはニジマスの内在性の α -グロビンmRNAにハイブリダイズしたシグナルで、検体中に外来遺伝子由来のRNAは存在しないか、あるいは存在しても非常に微量かのどちらかだと考えられる。

このように、発現が検出できなかった理由として、第1に今回用いたC α G断片に、発現を促進するエンハンサー領域が含まれていなかったことが考えられる。実際、Tuanら（1985）；Forresterら（1986）はヒトの β -グロビン遺伝子において強力なエンハンサーは β -グロビンの開始コドンより約50kb上流に存在する事を報告している。さらに、遺伝子導入マウスにおいて、この領域をヒト β -グロビン遺伝子のすぐ上流に接続することにより、その発現を強力に促進し（Curtinら,1989）、時期特異的な発現も促進することが報告されている（Enverら,1989）。すなわち、今回用いた

C α G4は上流域が約1.1kb、C α G5、6、7では約260bpの上流域が含まれているが、この領域には前述のエンハンサーが含まれていなかったのではないかと考えられる。

グロビン遺伝子は時期特異的に発現することは既に述べたが、コイにおけるC α G4、5、6、7の発現時期は全く同定されていない。したがって、第2の理由として、C α G4、5、6、7の本来の発現時期が成魚ではないため、今回調べた成魚の血球中にはC α G4のmRNAが検出できなかったという可能性もある。哺乳動物のグロビン遺伝子は、胚および胎児期にそれぞれ独自の遺伝子が働き、その後は成体型のグロビン遺伝子が発現する（服巻，1987）。したがって、魚類においてもこのような発生の極めて初期の段階に、グロビン遺伝子のスイッチングが起きている可能性が高いと考えられる。実際、Iuchi (1973) はニジマスにおいて孵化稚魚と成魚では、ヘモグロビンのアミノ酸組成および酸素結合能が異なることを報告している。さらに、シロザケ (Hashimoto and Matsuura, 1960)、ギンザケ、ベニザケ (Vanstoneら, 1964)、大西洋サケ (Westman, 1970; Hashimotoら, 1960)、ブラウントラウト (Hashimotoら, 1960)、カワマス、ニジマス (Yamanakaら, 1967) では年齢によってヘモグロビンの泳動像が変化したと報告している。特に、ギンザケ、ベニザケではスモルト化がヘモグロビンの電気泳動像に影響があると報告されており (Vanstoneら, 1964)、ヒラメでは変態にともなってヘモグロビンの電気泳動像が変化することが明らかになっている (Miwa and Inui, 1991)。さらに、キンギョでは飼育水温により同様の変化が見られると報告されている (Houston and Rupert, 1976)。したがって、今回用いたヘモグロビンは、ある特殊な環境下でのみ発現するタイプであった可能性もあり、それゆえに発現を検出できなかったとも考えられる。

このように、魚類のヘモグロビンの組成は発生段階および環境により異なるため、これらの変化を分子レベルで解決することが必要だと考えられる。また、これらヘモグロビンの遺伝子発現調節機構を解明することは、環境と遺伝子の発現調節を理解するうえで非常に興味深い問題だと考えられる。

第2節 ニジマスにおけるコイ α -グロビン遺伝子5' 上流域の機能

第1節においてC α Gがニジマス成体で発現しなかったことを述べ、エンハンサーの欠如および本来の発現時期の違いをその理由として挙げたが、これらの点を明らかにするためには、微量の発現を検出でき、かつ初期胚のように少量のサンプルからも、外来遺伝子由来のタンパク質を検出できるシステムが必要である。そこで、本節ではニジマス初期胚におけるC α Gの発現を解析するため、C α G3、4、5、6、7の上流域をCAT遺伝子上流に接続したC α GCATを作出しニジマスに導入後、その初期胚における発現をCATassayにより検出した。

材料と方法

プラスミドの作製

C α G3、5、6、7はMbo Iにより、さらにC α G4はAlu Iにより消化後、第2章 第1節の方法で5' 上流域を単離した。その後C α G3、5、6、7に関しては、末端をDNAランディングキット（宝酒造株式会社）により平滑化後、DNAライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用い、pUC118のHinc IIサイトにライゲーションし、村松ら(1988b)の方法により大腸菌DH1株を形質転換した。これらの中から目的の配列を持つコロニーを第2章 第1節と同様に、アルカリ法（村松ら, 1988c）、電気泳動法により選別した。さらにSma I、Hind IIIによる2重消化後、再度、C α G5' 上流域を含む断片を第2章 第1節の方法で単離した。一方、pRSVCATをNru I、Hind IIIにより2重消化し、RSVLTR領域を同様に除去後、これらのサイトに前述のC α G5' 上流域をDNAライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いライゲーションした。これらをDH1に形質転換後(村松ら, 1988b)、アル

カリ法(村松ら, 1988c)、電気泳動法により目的のクローンを単離した(図5-3)。さらにこれらのプラスミドは第2章 第1節の方法により大量培養後、Bam HI消化により、それぞれのC α GCAT断片をベクター配列から単離した。

マイクロインジェクションとサンプリング

C α G3CATを11.5ng/ μ l、C α G4CATは13ng/ μ l、さらにC α G5、6、7CATを9.5ng/ μ lになるように10mM Tris(pH 8.0), 0.1mMEDTA溶液に溶解し、各々のDNA断片を 10^7 コピーずつ含む2nlのDNA溶液をニジマス受精卵の1細胞期の細胞質にマイクロインジェクションした。サンプリングは受精後10日、20日、30日、45日、60日に行った。各ステージごとに全胚体を10尾ずつサンプリングし、発現の認められた実験区に関しては、10日胚では頭部、中間細胞群を含む躯幹部、尾部の筋肉および卵黄嚢をそれぞれ10尾よりサンプリングした。20日胚、30日胚では10日胚と同じ組織に加え、尾柄部切断により採取した血球も採取した。さらに、45日胚および60日胚では頭部、血球、尾部、肝臓、脾臓、消化管、および腎臓を含む躯幹部を採取した。

タンパク質の抽出とCAT assay

各サンプルから第4章 第1節と同様の方法によりタンパク質を抽出し、各400 μ g分のタンパク質(400 μ g未満のタンパク質しか抽出できなかった場合は全量を用いた)を含む組織抽出液を用いCAT assayを行った。さらに、オートラジオグラフィーにより得られたスポットを薄層板からかきとり、シンチレーターカクテル(Packard, Co.,Ltd.)に溶解し、液体シンチレーションカウンター(Tri-carb 1600TR, Packard Co.,Ltd.)により各スポット中に含まれるアイソトープ量を測定した。なお、400 μ g未満のタンパク質しか抽出できなかった組織では、400 μ g当たりのCAT活性に計算し直した結果を示した。

結果

5、6、7CATは本実験で調べたすべてのステージにおいて、ほとんど発現は認められなかった。3CATは、10日胚でアセチル化率13.72%と比較的高い値が認められたが、その後アセチル化率は徐々に減少し、45日胚以後ではほとんど発現は認められなかった。また、4CATは、10日胚でアセチル化率19.14%と高い値を示し、その後20日胚、30日胚でも各14.24%、16.86%と高レベルの発現が続いた。しかし、45日胚、60日胚では0.78%、1.56%と極めて少量の発現が認められたのみであった(図5-4)。

次に3CATの各ステージにおける各組織ごとの発現量について検討した結果、10日胚では頭部、躯幹部、尾部では各々1.98%、0.78%、2.56%と低アセチル化率を示したのに対し、卵黄嚢では13.72%と特異的に高い発現が認められた(図5-5)。続いて、20日胚では頭部で1.85%、躯幹部で0.92%、尾部で0.74%、卵黄嚢で1.52%と極めて低い発現しか認められなかったのに対し、血球で5.7%と比較的高い値が得られた(図5-6)。さらに、30日胚についても同様に血球でのみ5.1%のアセチル化率が認められたが、他の組織ではアセチル化率はいずれも1.05%~1.46%と低く、血球で特異的にCAT活性が高いことが判明した(図5-7)。

一方、4CATでは10日胚の全胚体で19.14%と高いCAT活性が認められたにもかかわらず、どの組織においても高い発現が認められた個体はなかった(図5-8)。また、20日胚では血球で13.17%と高い値を示したが、頭部で9.26%、躯幹部で4.73%と高い値を示した組織も存在した(図5-9)。さらに、30日胚では血球で8.3%、頭部で15.31%、躯幹部で16.37%、尾部で16.90%、卵黄嚢で5.63%とどの組織でも高いアセチル化率が得られ、はっきりした組織特異性は認められなかった(図5-10)。

考察

3CAT導入区では初期胚の造血組織および血球で特異的に発現が認められた。これらの結果は、今回用いたC α G3の5'上流域650bpに時期および組織特異性を担う配列が含まれていたためと考えられる。しかし、発現量はいずれも15%以下で高い値ではなかった。これは今回用いた配列にはエンハンサーのような遺伝子の発現を促進する領域が十分含まれていなかったことを示唆していると考えられる。実際、Chadaら(1986)とKolliasら(1986)はそれぞれ1.7kbおよび1.3kbの5'上流域を持つヒト γ -グロビン遺伝子をマウスに導入し、低レベルの発現しか得られていない。さらに、1.2kbの5'上流域を持ったヒト β -グロビン遺伝子を導入したマウスでも、本実験と同様に組織および時期特異性を示しながらも、低レベルの発現しか認められていない(Chadaら, 1985)。しかし、Townesら(1985)は4.3kbの5'上流域を持つヒト β -グロビン遺伝子をマウスに導入し、宿主のグロビンの30~40%量の発現を確認している。したがって、本実験でも導入に用いたC α G3の5'上流域の長さを増すことにより発現量の増加が期待される。また、Townesら(1985)は導入個体によって外来遺伝子の発現量が著しく異なることを報告しており、外来遺伝子が宿主の染色体に組み込まれる位置によってその発現量が左右されると推測している。しかし、本研究では12日胚頃までは宿主の染色体に組み込まれていない状態で存在する外来遺伝子が多く含まれていると考えられ、外来遺伝子の宿主細胞内での存在状態とその発現の関係も、今後検討する必要があると考えられる。さらに、ヒト β -グロビン遺伝子群では ϵ -グロビン遺伝子の約6.1~18.0 kb上流に散在するDNase I-hyper sensitive siteを含むlocus control region(以下LCR)が存在し、これらの領域が β -グロビン遺伝子群の組織および時期特異的発現を強力に促進することが知られている(Orkin, 1990; Dillonら, 1991)。さらに、これらの配列を β -グロビン遺伝子の上流に直接接続後、マウスに導入することにより、その発現を強力に促進すると報告されている(Grosveld, 1987)。また β -グロビン遺伝子群のLCRを α -グロビン遺伝子の上流に直接接続後、マウスに導入することにより、

α -グロビン遺伝子の発現は強力に促進され、内在性の α -グロビンとほぼ等量の外来ヒト α -グロビンが産生されたことを報告している (Ryan, 1989)。したがって、コイ α -グロビン遺伝子についてもこのLCRを同定し、目的のグロビン遺伝子の5'上流に接続することにより、外来のグロビン遺伝子の発現量を大幅に増加させることが可能と期待される。近年、ヒト α -グロビン遺伝子のLCRも同定され (Orkin, 1990)、魚類においても今後、このようなクロマチンの高次構造の変化による遺伝子発現調節機構、およびDNA結合タンパク質による遺伝子発現調節機構を解明していくことが必要不可欠と考えられる。

4CAT導入区では10~30日胚において14%以上の発現が続いたが、どの時期においてもはっきりとした組織特異性は認められなかった。Lacyら (1983) も同様に本来グロビン遺伝子が発現する組織とは異なる組織での発現を確認している。これは組織特異性を担う配列が導入に用いた遺伝子には欠けていたためと考察しているが、Townesら (1985) は、Lacyら (1983) がベクター配列に組み込まれたままのグロビン遺伝子を用いたため、その発現が抑制されたのではないかと推測している。しかし、本研究では完全にベクター配列を除いた遺伝子を導入に用いており、C α G4の5'上流域950bpには組織特異性を担う配列が含まれていなかったと考えられる。一方、LCRを接続したヒト β -グロビン遺伝子導入マウスでは、マウスの胚においては組織特異的発現が認められないと報告されており (Blom van Assendelftら, 1989; Behringerら, 1990; Enverら, 1990; Lindenbaum and Grosveld, 1990)、LCRと β -グロビン遺伝子の間に γ -グロビン遺伝子を接続すると正確な発現が起きると報告されている (Behringerら, 1990; Enverら, 1990)。このようにグロビン遺伝子の発現には、グロビン遺伝子群の相互作用が極めて重要な役割を果たしており、魚類においても同様の調節が行われている可能性が高いと推測される。

さらに、5、6、7CAT導入区ではほとんど発現は認められなかったが、これらの遺伝子では5'上流域が約260bpと短かったため、発現に必要な最低限の領域が含まれていなかったと考えられる。しかし、これらの遺伝子が本実験で解析した発生段階では本来発現しない遺伝子であった可能性、あ

るいは本来極めて微量しか発現しないタイプの遺伝子であった可能性もあるため、今後コイの各発生段階においてどの遺伝子がどのくらいの量発現しているのかを正確に同定する必要があると考えられる。

第3節 コイ成体で発現している β -グロビンcDNAの同定

第1節ではニジマス成魚においてコイ α -グロビン遺伝子は発現せず、第2節ではニジマス初期胚においてC α G3CAT以外は正確には発現していなかった。これらの問題は、導入に用いた各々の α -グロビン遺伝子の本来発現している時期と場所が、同定されていないという点が大きな原因の一つと考えられる。そこで、コイ体内で各時期に発現しているグロビン遺伝子を同定するとともに、各遺伝子の発現量を測定する必要がある。しかし、魚類においては、コイ成体から1種類の α -グロビンcDNAが単離されているのみで (Takeshitaら, 1984)、その多型性や発現時期に関する遺伝子レベルの研究はほとんど成されていない。そこで高等動物でその発現調節機構が極めて良く研究されている β -グロビンをモデルに用い、まずコイ成体で発現している β -グロビン分子を同定するため、コイ β -グロビンcDNAをクローニング後、それらの塩基配列を決定し、各タイプの発現量を算出した。

材料と方法

mRNAの抽出

東京水産大学屋外水槽で飼育されたコイ3年魚より1mlの血液を採取し、約80 μ lずつ微量遠心チューブに分注後、淡水魚用リンゲル液で洗浄した。その後RNA extraction buffer 250 μ lに血球を懸濁し、さらにproteinase digestion buffer 250 μ lを加え、直ちにボルテックスミキサーで混和した。その後、25Gの注射針を接続したシリンジ内にサンプルを急激に入れすることにより、サンプル中に含まれる高分子DNAを物理的に破壊した。その後、proteinase Kを終濃度200 μ g/mlとなるように加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間保温し、タンパク質を分解した。その後フェノール：クロロホルム（24:1）（以下フェノクロとする）で2回抽出した後、エタノール沈殿を行い、全核酸を精製した。次に各チューブに200 μ lの50mM Tris HCl (pH 7.8), 1mM EDTA, 10mM MgCl₂, 0.1mM dithiothreitol溶液に溶解した後、RNase-freeのDNase Iを70units加え、DNAを特異的に分解した。さらに、フェノクロ抽出を2回行った後、エタノール沈殿により全RNAを抽出した。その後、全量の30分の1ずつを吸光度計による濃度測定、および電気泳動による分解の有無の確認に用いた。その後、日本ゴム（株）のOligotex dT 30を用い、藤本ら（1991）の方法によりmRNAを特異的に回収した。

cDNAライブラリーの作成

得られたmRNA全量を鋳型にし、cDNA synthesiskit (Pharmacia Co., Ltd.)を用いてcDNAを合成した。すなわち、Oligo dTをプライマーにし、Molony leukemia virus由来の逆転写酵素により1st.strand cDNAの合成を行った。その後、Gubler and Hoffman (1983)の方法により2nd.strand cDNAの合成を行った。これらの反応液をSephacrylS-300 (Pharmacia Co., Ltd.)によりゲル濾過後、Eco RIアダプターをT4 DNA ligase (Pharmacia Co., Ltd.)を用いて接続した。その後、同様のゲル濾過をもう一度行い精製後、cDNA溶液4 μ lと、Eco RI (東洋紡績株式会社)消化後、末端のリン酸基を除去した (村松ら, 1988f) pUC118 50ngとを、T4 DNA ligase (Pharmacia Co., Ltd.)によりライゲーションした。その後、これらの反応液を大腸菌 JM109株に村松ら (1988b)の方法によりトランスフォーメーションすることにより

cDNAライブラリーを作製した。

スクリーニング

得られたcDNAライブラリーを、既にクローニングされているコイ α -グロビンcDNA (Takeshitaら, 1984) をプローブに用いたコロニーハイブリダイゼーションにより、 α -グロビンのcDNAと思われるクローンを除いた。次に残りのクローンからアルカリ法 (村松ら, 1988c)によりプラスミドを抽出し、Eco RI消化後、アガロースゲル電気泳動により、コイ β -グロビンcDNAの長さと思われる500~700bpのインサートDNAをもつクローンを選別した。さらに、これらのクローンを鋳型にし、Grujic-Injacら (1980)により決定された、コイ β -グロビンアミノ酸配列の1~8残基目までと、149~155残基目までに対応する塩基配列を合成したミックスプライマー (図5-11)を用いたPCR法により、増幅の有無を確認した。そこで増幅の認められたクローンに関しては塩基配列の決定を行った。

塩基配列の決定

鋳型に用いるプラスミドDNAは通常のアルカリ法 (村松ら, 1988c)の後、

DNA溶液の60%量のPEG溶液を加え攪拌し、氷上に1時間放置後、13500rpmで20分間4℃で遠心分離することによりプラスミドDNAのみを回収した。これらのDNA溶液のうち、5 μ g分を18 μ lの蒸留水に溶解後、2 μ lの2N NaOHを加え1本鎖にした。標識はDeoxyadenosine 5'-(α -thio) triphosphate, [³⁵S] (NEN Research Products Co.,Ltd.)を用いてT7 Sequencing kit (Pharmacia Co.,Ltd.)により行った。なお各クローンともM13 Primer RV(宝酒造株式会社)を用いた逆向きのシーケンシングも同時に行った。得られた反応液を80℃で5分間処理し、1本鎖にした後、6%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により展開した。その後、得られたゲルをシーケンシングゲル固定液中で15分間固定し、ゲル乾燥器によりゲルを乾燥させ、オートラジオグラフィーを行った。

2次スクリーニング

塩基配列より β -グロビンcDNAと確認されたクローンをプローブに用いて、前述の方法によりコロニーハイブリダイゼーションを行いスクリーニングした。なお、得られたクローンについては塩基配列を決定し各タイプに分類後、各々のクローンの発現量を得られたクローン数より算出した。

結果

1mlのコイ血液より回収した全血球より約400 μ gの全RNAが抽出でき、この中からpoly Aを持つmRNAは約4 μ g単離できた。これら全量を用いてcDNAを合成し、その1/50量を用いてcDNAライブラリーを作製したところ、約150クローンのインサートDNAを含むコロニーが得られた。このcDNAライブラリーをコイ α -グロビンcDNAを用いてスクリーニングした結果、30コロニーにハイブリダイズした。そこで、残り120クローンのうち26クローンのインサートDNAの長さを調べたところ、11クローンが500~700bpの長さであった。さらに、これらの11クローンのうちPCR法により増幅の認められたクローンが3クローン存在した。そこで、これらのうちの1クローンについて全塩基配列を決定した。このDNA断片は441bpより成るアミノ酸コード領域を含み、この領域をアミノ酸配列に翻訳した配列は、Grujic-Injacら(1980)により決定されたコイ β -グロビンアミノ酸配列と93.9%のホモロジーを示した。このように、明らかにこのクローンがコイ β -グロビンcDNAであることが証明されたので、このcDNA断片をプローブに用いて再度151クローンのcDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果34個のクローンにハイブリダイズした。そこで、これらのクローンのインサート長を調べ、完全長のcDNAがクローニングされていると考えられる28クローンの塩基配列を決定した。これらのクローンは全て開始コドン(ATG)と終止コドン(TAG)にはさまれた441bpのアミノ酸コード領域を含み、合計6種類のタイプに分類できた。図5-12にはこれらの全塩基配列を示した。最上段にこれらのうち1種類の全塩基配列を示し、2~6の塩基配列に関しては1と異なる塩基のみを示した。またpoly A 付加配列と考えられるAATAAAの構造は終止コドンより87bp下流に1つ存在した。さらに、これら6種類の各クローン間のホモロジーは表5-1に示したように96.0%~99.6%と極めて高く、どのクローンも非常に類似していた。また、これら各クローンの得られた割合は、1と2が28.6%、3が21.4%、4が14.3%、5と6が3.6%であった。

次に、これらの塩基配列をアミノ酸に翻訳した結果を図5-13に示した。

塩基配列の2と3、4と6はそれぞれサイレント変異しか存在せず、同じアミノ酸配列をコードしていた。4種のアミノ酸配列相互間のホモロジーは、表5-2に示したように95.2%~99.3%と非常に高い値であった。さらに、4アミノ酸間の変異は122残基から126残基までに集中して起きていた。また、これらの4種のアミノ酸の発現している割合は、C β G2と3でコードされるタイプが50%、C β G1がコードするタイプが28.6%、C β G4と6がコードするタイプは17.9%で、C β G5がコードするタイプは3.6%しか存在しなかった。

考察

今回得られたクローンはすべて、開始コドンATGと終始コドンTAGには含まれた441bpのアミノ酸コード領域を含み、147残基のアミノ酸をコードしていた。ヒト(Lawnら, 1980)およびニワトリ(Dolanら, 1983)の β -グロビンは共に146残基で、コイより1残基短く、さらにXenopus(Williamsら, 1980)の β -グロビンは145残基で、2残基短かった。しかし、ニジマスの β -グロビン4(Petruzzeliら, 1984)、ハイギョ(Rodewaldら, 1984a)およびキンギョ(Rodewaldら, 1984b)の β -グロビンは147残基であり、この特徴は魚類の β -グロビン特有であると考えられた。さらに今回得られたすべてのクローンで、TAGが終止コドンとして用いられていたがヒト(Lawnら, 1980)、マウス(Konkelら, 1978)、ニワトリ(Dolanら, 1983)およびXenopus(Williamsら, 1980)では終止コドンはTAAであり、今回のTAGでコードされる終止コドンもコイの β -グロビンの特徴と考えられる。またコイ β -グロビンcDNAには、この終止コドンの87bp下流にpoly A付加シグナルと考えられるAATAAA配列が存在した。しかし、Xenopus、マウス、ウサギ、ヒト、ニワトリで見出されているAATAAAのすぐ下流側に存在するDyad

Symmetry配列 (Williamsら, 1980) は今回得られたクローンでは認められなかった。

本研究では6種類の β -グロビンcDNAが得られ、これらのC β Gは4種類のアミノ酸をコードしており、特にこれらのうちの3種類ではかなりの発現量が認められた。一方、ヒトでは5種類の機能し得る β -グロビン遺伝子が存在するが、成体で発現しているのはそれらのうち4種類であり、全 β -グロビン量の1~2%が γ -グロビン、 δ -グロビンで、他のほとんどが β -グロビンである (服巻, 1987)。このように、コイ成体で複数の β -グロビン遺伝子が発現しているのは、コイが種々の酸素結合特性を持ったグロビン分子を同時に産生することにより環境の激変に適応しているのではないかと考えられる。すなわち、陸上に生息する生物は、空気中の酸素量が急激に変動することが稀であるため、通常的环境下で効率良く酸素を供給できるグロビンしか必要ないが、溶存酸素量が急変することの多い水中に生息するコイは、それぞれの環境下で効率良く機能し得るグロビン分子を常に一定量の割合で産生していくことにより、環境の急変の供えていると考えられる。実際、幾つかの生物で、酸素結合特性の異なるヘモグロビンが存在することが報告されている。例えば、ヒトの胎児は胎盤での低酸素環境下では、ジホスホグリセリン酸への結合能が弱い胎児型ヘモグロビンを産生することにより、効率良く母体の血液から酸素を得ている (Gilbert, 1991)。さらに、ニジマスでも胚と成体では酸素結合特性の異なるヘモグロビンが存在する (Iuchi, 1973)。また、淡水と海水の両方で生活するサケ (Hashimotoら, 1960; HashimotoとMatsuura, 1961)、ウナギ (山口ら, 1962; Shimadaら, 1980) では各々Bohr効果の小さい海水魚型のヘモグロビンとBohr効果の大きい淡水魚型のヘモグロビンを持つと報告されている。さらに、ウナギのこれら2種類のヘモグロビンは有機リン酸による影響も全く異なると報告されている (Okazakiら, 1974)。また、ドジョウでも同様のヘモグロビン多型が報告されており (山口ら, 1963)、コイにおいても本研究で同定した4種類の β -グロビンが、各々異なった機能を果たしている可能性は大きいと推測される。しかし、2組の β -グロビン遺伝子が同じアミノ酸をコードしていた点に関しては環境への適応とは考えにくい。

これはコイ属魚類が倍数体起源である点から（新井，1985）、倍数化にともなって遺伝子重複が生じた結果であろうと考えられる。高等動物のグロビン遺伝子群には、偽遺伝子と呼ばれる機能していない遺伝子が存在する。これは遺伝子重複によって生じた後、変異が起これり不活化したと考えられており（服巻，1987）、今回検出できなかったC β G1または5に対応する遺伝子も、発現しない状態で染色体中には存在する可能性が高いと考えられた。

今回単離したC β Gは、1から6まで各々28.6%～3.6%と各クローン毎に特有の発現量を示したが、これは各cDNAをコードしている遺伝子がそれぞれ独自の発現調節領域を持ち、遺伝子毎に発現の調節が成されていることを示している。前に述べたようにヒト成体でも β -グロビン、 δ -グロビン、 γ -グロビン遺伝子は常に一定の割合で発現しており、これらの発現量の割合の調節は、全て各遺伝子の上流域、下流域の発現調節領域によりその転写量が調節されているためと考えられている（服巻，1987）。最近ではこれらの各遺伝子の発現量が相互に調節し合っているという現象も報告されており（Dillonら，1991）、魚類でもこれらのグロビン遺伝子をクローニングし、その発現調節機構が解明されることが期待される。さらに遺伝子導入にこれらの遺伝子を用いる場合はC β G1、C β G2などの転写量の多いmRNAをコードしている遺伝子を選択することにより、宿主内での導入遺伝子の高レベルでの発現が期待される。

次にこれらのcDNAをアミノ酸配列に翻訳し、種々の生物の β -グロビンのアミノ酸配列とホモロジーを比較した結果を表5-3に示した。ヒト（Lawmら，1980）とは51.0～52.4%、ニワトリ（Dolanら，1983）とは56.5～57.8%、さらにXenopus（Williamsら，1980）とは43.5%～44.2%といずれも魚類以外の生物とのホモロジーは低い値であった。他の魚種ではニジマスの β -グロビン1（Barraら，1983）とは65.1%～65.8%、ニジマスの β -グロビン4（Petruzzeliら，1984）とは76.9%～78.2%と比較的高い値を示し、キンギョ（Rodewaldら，1984b）の β -グロビン96.6%～98.0%と非常に高いホモロジーを示した。しかし、ハイギョ（Rodewaldら，1984a）とは43.5%～44.9%で魚類の中でもハイギョの β -グロビンは極めて特化が進んだ分子

であることが示唆された。また、Grujic-Injacら(1980)によって決定されたコイ β -グロビンとは89.1%~93.9%とあまり高いホモロジーは得られなかった。

ヘモグロビン分子は各2本の α 鎖と β 鎖、計4本が結合しており、それぞれに1分子のヘムが結合している。これらのサブユニットは $\alpha 1$ を基準にして鉄原子間の距離の近い β 鎖を $\beta 1$ 、遠い β 鎖を $\beta 2$ と呼ぶが(水上, 1977)、サブユニット相互間の接触、およびヘムとの接触がこれらの4次構造の決定およびその機能上で非常に重要であるといわれている(Perutz, 1969)。図5-14にヒト β -グロビンがヘムと接触しているアミノ酸残基、 $\alpha 1\beta 1$ 接触および $\alpha 1\beta 2$ 接触しているアミノ酸残基を示し(水上, 1977)、その下段に今回決定したコイ β -グロビンのアミノ酸配列を示した。さらに、これらのヒトおよびすべてのコイ β -グロビンに相同な配列を持つ残基にアステリスクを付した。まず、92残基目のヒスチジンは遠位ヒスチジンと呼ばれるもので、このヒスチジンのイミダゾール基とヘムが配位結合により結合しているが、この残基はヒトを含むすべての β -グロビンにおいて保存されていた。さらに、63残基目のヒスチジンはヘムに酸素分子が結合する時に影響を及ぼす近位ヒスチジンと呼ばれる残基だが、これもヒトを含む全ての β -グロビン分子に保存されていた。また、ヘムと接触しているアミノ酸は下線で記したが、この領域ではコイのすべてのタイプの β -グロビンアミノ酸配列は同一であった。ヒトとコイの β -グロビン全領域のホモロジーは、51.0~52.4%であるのに対して、ヘム接触領域ではホモロジー71.4%とかなり良く保存されていた。さらに、図中で2重下線で示した残基は $\alpha\beta$ 各サブユニット間の接触を示しているが、これらの領域のヒトとコイとのホモロジーは64~68%で、先程同様良く保存されていることが明らかになった。特に、ヘモグロビンが酸素分子を取り込む時に重要な $\alpha 1\beta 2$ 接触をしている残基には丸印を付したが、この領域ではすべてのタイプのアミノ酸配列は同一で、ヒトとのホモロジーも86%と極めて高い値を示した。以上のように、ヘモグロビンの基本的な機能および立体構造を形成する上で重要な領域は、コイにおいてもヒトと類似していることが明らかになった。さらに、93残基目のセリンは魚類のRoot効果に必須のアミ

ノ酸であるとされているが (Perutz, 1983)、このセリンも全ての β -グロビンで保存されていた。

しかし、今回決定したアミノ酸配列のうち121残基目から126残基目までは、得られた4タイプの β -グロビンすべてで異なっていた。この領域はヒト β -グロビンではGH4からH3にまたがる領域で、特にGH5からH3までは $\alpha 1 \beta 1$ 接触している領域でもある (水上, 1977)。コイが前述の環境の急変に備えて複数のグロビン分子を同時に産生していると仮定すると、この領域が各々の β -グロビンの酸素結合特性を担っている領域である可能性も高いと考えられる。今後これら各分子の酸素結合特性を含め、さらに解析が必要と思われる。

総括

本研究では、第1章において従来の方法に代わる効率のよいニジマス卵へのマイクロインジェクション技法を開発し、第2章ではその技法を用いて実際に種々の外来遺伝子をニジマスに導入することに成功した。本法は、1時間当たり約50粒の卵にマイクロインジェクションが行え、実験室規模での遺伝子導入には十分と考えられるが、実際に種苗生産に応用するには効率の悪い方法である。さらに、コイ精子へのエレクトロポレーションによる外来遺伝子の導入も可能であったが、容易に大量の個体を作出できるという大きな利点をもつものの、導入個体を選別する際に行うサザンブロット解析はマイクロインジェクションの時と同様時間を要するため、遺伝子導入魚を種苗生産レベルで直接的に大量生産するには効率のよい方法とはいえない。したがって、遺伝子導入魚を種苗生産に用いるためには、マイクロインジェクション法またはエレクトロポレーション法により作出した個体を親魚として用い、外来遺伝子をホモに持つ個体を作出し、これを親魚に用いることが必要である。すなわち、これらのホモ個体と通常の個体を交配すれば、得られた次世代はすべての個体において外来遺伝子をヘテロに持つことになり、遺伝子導入個体を大量に生産することができると考えられる。第3章では、宿主の染色体に組み込まれた外来遺伝子が、メンデルの法則に従って遺伝することが明らかになったため、ホモ個体の作出には導入個体から得た卵を雌性発生処理することによって外来遺伝子をホモ化するか、同個体より得られた子供のうち、同一の遺伝子座に外来遺伝子が組み込まれている個体を選んで兄妹交配すると、孫世代の25%がホモ個体になることが期待される。

本研究で得た遺伝子導入魚において、外来遺伝子が宿主染色体に組み込まれた量および位置は一定ではなかった。哺乳類においては、すでにgene targetingと呼ばれる技術が開発されており (Capecchi, 1989)、特定の遺伝子座に外来遺伝子を1コピーだけ挿入することが可能となっている。従来、選抜で固定してきた特定の遺伝形質は、その形質を支配している複数の遺伝子の発現調節領域のわずかな塩基の置換、挿入、欠失などに起因し

ていると推測される。したがって、このgene targetingが実用化すれば容易にそのような変異を個体の内在性の遺伝子に導入することができ、極めて有効な育種技法として期待される。近年、本法に必要不可欠なキメラ個体の作出技法がゼブラフィッシュ(Liuら, 1992)、メダカ(若松ら, 1992)、キンギョ(山羽と山崎, 1992)において、開発されている。したがって、第1章で開発したマイクロインジェクション技法をキメラ個体の作出に適用すれば、変異を導入した細胞を容易に個体に導入できると思われる。

第4章では、まず、RSVCATを導入したニジマスにおける、外来遺伝子の発現時期について検討した。その結果、外来遺伝子の発現量は胞胚期から発眼期までは高レベルで推移した。さらに、受精後70日の胚ではRSVCATが宿主の染色体に組み込まれた状態で発現し、一部の個体ではこれらのRSVCATが次世代へ伝達した後も安定して発現した。このように、本研究では外来遺伝子を一過性ではなく、宿主染色体中に組み込まれた状態で安定して発現させることに成功した。以上の結果より、RSVLTRおよびSV40のターミネーターは、ニジマス体内で外来遺伝子を発現させるために、極めて有効であることが判明した。したがって、RSVLTRの下流に水産上有用な形質を担う遺伝子を接続し、さらにその下流にSV40のターミネーターを接続したDNA断片をニジマスに導入すれば、その遺伝子が担う形質を個体に付加することが可能と考えられた。

しかし、魚類においてより効率よく外来遺伝子の発現を促進し、かつ組織、時期特異性を担う遺伝子発現調節領域を開発するためには、魚類自身の遺伝子あるいは魚類細胞を宿主とするウイルスの遺伝子発現調節領域を用いることが必要と考えられる。そのためには魚類自身の遺伝子の発現調節機構の解明が必要不可欠と考えられたため、第5章では、魚類のグロビン遺伝子を選んで、その発現について解析した。コイC α G4,5,6,7を導入したニジマス成魚では、その発現は認められなかったものの、C α G3CATを導入したニジマス稚魚においては、造血組織および血球特異的に発現が認められた。さらに、コイ β -グロビン遺伝子は成体で6種類の遺伝子が機能し、それらは4種類の異なるアミノ酸をコードしていた。また、各遺伝子毎にその発現量は異なっており、各遺伝子毎に独自の発現調節がなされて

いることが示唆された。このように、魚類グロビン遺伝子も組織特異的発現、および各成分毎に発現量の調節が成されていることが判明した。

将来、これら外来遺伝子の導入、遺伝、発現といった一連の過程が完成し、実際に水産養殖に応用するには、魚類に導入する形質（これを担っている遺伝子）について詳細に解析する必要があると考えられる。すなわち、目的の形質がどのようなタンパク質によって支配されているのかを明らかにした後、そのタンパク質の生理機能や発現部位、作用部位等を解明し、その遺伝子をクローニングする必要がある。従来、魚類の遺伝形質に関して、分子レベルで解析され、かつ育種に応用されている例は非常に少ない。本研究においてもコイの α -グロビン遺伝子をニジマスに導入することにより、ニジマスにコイのもつ低酸素耐性の付加を試みたが、ニジマス体内で、コイ α -グロビンの産生は認められなかった。したがって、このような研究を成功させるには、あらかじめ、コイの内在性のグロビンを詳細に解析しておく必要があると考えられる。

最後に、これらの遺伝子導入魚を水産養殖に利用するに際しては、いわゆる封じ込めが必要である。すなわち、これらの個体が天然の水界へ逸脱することのないような方法、あるいはもし逸脱しても、次世代を作らないような処理が必要である。前者を実行するためには、飼育設備を完備することにより逃亡を防げると考えられるが、現在の養殖現場では不可能と思われる。後者には初期胚の時点で γ 線を照射して不妊化する方法(田代, 1972)、3倍体化する方法(上野, 1989)等が考えられるが、今後一層確実な不妊化技法の開発が望まれる。また、培養細胞では種々の酵素の欠損株が得られており、これらの細胞は特殊な培地でしか成育しない(瀬野, 1989)。したがって、このような現象を個体にも応用できれば、限られた環境下でのみ成育できる個体を作成することも可能と思われる。また、前述のgene targetingによる内在性遺伝子の改変が魚類でも可能になれば、従来選抜で行ってきた育種と同様の操作を短期間で行える上、安全性の面からも問題は少ないと考えられ、本研究の主題は、今後この方面に展開する必要があると思われる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜わった東京水産大学資源育成学科教授隆島史夫博士に深謝する。また、研究遂行に際して、適切な御助言を頂いた同助手酒井 清博士およびカルロス・ストルスマン博士に感謝する。

本論文の御校閲を賜わり、有益な御教示を頂いた東京水産大学資源育成学科教授多紀保彦博士、同助教授岡本信明博士および尾城 隆博士に厚く御礼申し上げる。

また、実験に際して種々の御配慮を賜わった、東京水産大学大泉実験実習場河西晴之、三井拓也両技官、および遺伝子操作技法について御指導して下さい、宮崎大学教授青木 宙教授ならびに水産衛生学講座の方々に深謝する。

最後に、種々の協力をして下さった種苗育成学研究室および水族養殖学研究室内の諸氏に感謝する。

引用文献

- 新井良一, 1986; 分岐分類学に基づく魚類の系統分類と核型. 海洋科学, 17(2), 119~112.
- Barra, D., Petruzzelli, R., Bossa, F. and Brunori, M., 1983; Primary structure of hemoglobin from trout (salmo irideus) Amino acid sequence of the β chain of trout Hb I. *Biochimica et biophysica acta*, 742, 72~77.
- Behringer, R.R., Ryan, T.M., Reilly, M.P., Akakura, T., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. and Townes T.M., 1990; Synthesis of functional human hemoglobin in transgenic mice. *Science*, 245, 971~973.
- Bishop, J.O. and Smith, P., 1989; *Mol. Biol. Med.*, 6, 283~.
- Blom van Assendelft, G., Hanscombe, O., Grosveld, F. and Greaves, D.R., 1989; The β -globin domain control region activates homologous and heterogous promoters in a tissue-specific manner. *Cell*, 56, 969~972.
- Brem, G., Brenig, B., Horstgen-Schwark, G. and Winnacker, E.L., 1988; Gene transfer in tilapia (Oreochromis niloticus). *Aquaculture*, 68, 209~219.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Yagle, M.K. and Palmiter, R.D., 1985; Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 4438~4442.
- Capecci, M.R., 1989; Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 244, 1288~1292.
- Chada, K., Magram, J., Raphael, K., Radice, G., Lacy, E. and Costantini, F., 1985; Specific expression of a foreign β -globin gene in erythroid cells of transgenic mice. *Nature*, 314, 377~376.

- Chada, K., Magram, J. and Costantini, F., 1986; An embryonic pattern of expression of a human fetal globin gene in transgenic mice. *Nature*, 319, 685~688.
- Chong, S.S.L. and Vielkind, J.R., 1989; Expression and fate of CAT reporter gene microinjected into fertilized medaka (*Oryzias latipes*) eggs in the form of plasmid DNA, recombinant phage particles and its DNA. *Theor. Appl. Genet.*, 78, 369~380.
- Chourrout, D., Guyomard, R. and Houdebine, L.M., 1986; High efficiency gene transfer in rainbow trout (*salmo gairdneri* rich.) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture*, 51, 143~150.
- Costantini, F. and Lacy, E., 1981; Introduction of a rabbit β -globin gene into the mouse germ line. *Nature*, 294, 92~94.
- Culp, P., Nusslein-Volhard, C. and Hopkins, N., 1991; High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7953~7957.
- Curtin, P.T., Liu, D., Liu, W., Chang, J.C. and Kan, Y.W., 1989; Human β -globin gene expression in transgenic mice is enhanced by a distant DNase I hypersensitive site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7082~7086.
- Dillon, N., Talbot, D., Philipsen, S., Hansconbe, O., Fraser, P., Pruzina, S., Lindenbaum, M. and Grosveld, F., 1991; The regulation of human β -globin locus. *Genome Analysis*, 2, 99~119.
- Dolan, M., Dodgson, J.B. and Engel, J.D., 1983; Analysis of the adult chicken β -globin gene. *J. Biol. Chem.*, 258, 6,3983~3990.
- Du, S.J., Gong, Z., Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J., Idler, D.R. and Hew, C.L., 1992; Growth enhancement in transgenic atlantic salmon by the use of an "All Fish" chimeric growth hormone gene construct. *Bio/technology*, 10, 176~181.

- Dunham, R.A. and Eash, J., 1987; Transfer of the metallothionein-human growth hormone fusion gene into Channel Catfish. Trans. Am. Fish. Soc., 116, 87~91.
- Enver, T., Ebens, A.J., Forrester, W.C. and Stamatoyannopoulos, G., 1989; The human β -globin locus activation region alters the developmental of a human fetal globin gene in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7033~7037.
- Enver, T., Raichi, N., Ebens, A.J., Papayannopoulou, T., Costantini, F. and Stamatoyannopoulos, G., 1990; Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. Nature, 344, 309~313.
- Etkin, L.D., Pearman, B., Roberts, M. and Bektesh, S.L., 1984; Replication, integration and expression of exogenous DNA injected into fertilized eggs of Xenopus laevis. Differentiation, 26, 194~202.
- Fletcher, G.L., Shears, M.A. and King, M.J., 1988; Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atrantic Salmon. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 45, 352~357.
- Fletcher, G.L. and Davies, P.L., 1991; Transgenic fish for aquaculture. Genetic Engineering, 13, 331~370.
- Forrester, W.C., Thompson, C., Elder, J.T. and Groudine, M., 1986; A developmentally stable chromatin structure in the human β -globin gene cluster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1359~1363.

- Friedenreich, H. and Scharf, M., 1990; Transient expression directed by homologous and heterologous promoter and enhancer sequences in fish cells. *Nuc. Acids. Res.*, 18, 3299~3305.
- 服卷保幸, 1987; グロビン遺伝子とその発現, 蛋白質 核酸 酵素, 32, 478~495.
- Gilbert, S.F., 1991; 哺乳類の新生児における血流の転換. 「発生生物学」上, トッパン, 東京, pp.242~244.
- Gong, Z., Hew, C.L. and Vielkind, J.R., 1991; Functional analysis and temporal expression of promoter regions from fish antifreeze protein genes in transgenic Japanese medaka embryos. *Molec. Marine Biol. and Biotech.*, 1, 64~72.
- Gordon, J.W. and Ruddle, F.H., 1985; DNA-mediated genetic transformation of mouse embryos and bone marrow. *Gene*, 33, 121~136.
- Gorman, C.M., Moffat, L.F. and Howard, B.H., 1982a; Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 2, 1044~1051.
- Gorman, C.M., Merlino, G.T., Willingham, C. Pastan, I. and Howard, B.H., 1982b; The rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6777~6781.
- Gross, N.L., Schneider, J.F., Moav, N., Moav, B., Alvarez, C., Myster, S. H., Liu, Z., Hallerman, E.M., Hackett, P.B., Guise, K.S., Faras, A.J. and Kapuscinski, A.R., 1992; Molecular analysis and growth evaluation of northern pike (*Esox lucius*) microinjected with growth hormone genes. *Aquaculture*, 103, 253~273.

- Grosveld, F., Assendelft, G. B., Greaves, D. R. and Kollias, G., 1987; Position-independent, high-level expression of the human β -globin gene in transgenic mice. *Cell*, 51, 957~985.
- Grujic-Injac, B., Braunitzer, G. and Stangi, A., 1980; Die sequenz der β A- und β B-ketten der hamoglobine des karpfens (Cyprinus carpio L.). *Hoppe-Seyler's Z Physiol. chem.*, 361, 1629~1639.
- Gubler, U. and Hoffman, B. J., 1983; A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 25, 263.
- Guyomard, R., Chourrout, D., Leroux, C., Houdebine, L. M. and Poirrain, F., 1989; Integration and germ line transmission of foreign genes microinjected into fertilized trout eggs. *Biochemie*, 71, 857~863.
- 花岡和則, 1992; キメラ解析のための導入遺伝子マーカー. *実験医学*, 10, 38-42.
- Hashimoto, K. and Matsuura, F., 1960; Comparative studies on two hemoglobins of Salomon-V. Change in proportion of two hemoglobins with growth. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 26, 931~937.
- Hashimoto, K., Yamaguchi, Y. and Matsuura, F., 1960; Comparative studies on two hemoglobins of salmon -IV. Oxygen dissociation curve. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 26, 827~834.
- Hayat, M., Joyce, C. P., Townes, T. M., Chen, T. T., Powers, D. A. and Dunham, R. A., 1991; Survival and integration rate of channel catfish and common carp embryos microinjected with DNA at various developmental stages. *Aquaculture*, 99, 249~255.
- Hogan, B., Cosantini, F. and Lacy, E., 1986a; Manipulating the mouse embryo. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp.157~160.
- Hogan, B., Cosantini, F. and Lacy, E., 1986b; Manipulating the mouse embryo. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp.153~156.

- Houston, A.H. and Rupert, R., 1976; Immediate response of the hemoglobin system of the goldfish, Carassius auratus, to temperature change. *Can. J. Zool.*, 54, 1737~1741.
- Inoue, K., Ozato, K., Kondoh, H., Iwamatsu, T., Wakamatsu, Y., Fujita, T. and Okada, T.S., 1989; Stage-dependent expression of the chicken δ -crystallin gene in transgenic fish embryo. *Cell Differ. Develop.*, 27, 57~68.
- Inoue, K., Yamashita, S., Hata, J., Kabeno, S., Asada, S., Nagahisa, E. and Fujita, T., 1990; Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. *Cell Differ. Develop.*, 29, 123~128.
- Inoue, K., Yamashita, S., Akita, N., Mitsuboshi, T., Nagahisa, E., Shiba, T. and Fujita, T., 1991; Histochemical detection of foreign gene expression in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 1511~1517.
- 板沢靖男, 1977; 血液. 「魚類生理」(川本信之編)改訂版, 恒星社厚生閣, 東京, pp.3~23.
- Iuchi, I., 1973; Chemical and physiological properties of the larval and adult hemoglobins in rainbow trout, Salmo gairdneri irideus. *Comp. Biochem. Physiol.*, 44B, 1087~1101.
- Iwamatsu, T., 1983; A new technique for dechoriation and observations on the development of the naked eggs in Oryzias latipes. *J. Exp. zool.*, 228, 83~89.
- 加藤禎一, 1982; 養殖の基礎的知識: 育種. 「淡水養殖技術」(野村稔編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.61~77.
- 勝木元也, 1987a; DNAの定量. 「発生工学実験マニュアル」(勝木元也編) 講談社サイエンティフィック, 東京, pp.138~139.
- 勝木元也, 1987b; ハイブリダイゼーションとフィルターの洗浄. 「発生工学実験マニュアル」(勝木元也編), 講談社サイエンティフィック, 東京, pp.159~167.

- 勝木元也, 1987c; ノーザンハイブリダイゼーション. 「発生工学実験マニュアル」 (勝木元也編), 講談社サイエンティフィック, 東京, pp. 193.
- 勝木元也, 1987d; 制限酵素によるDNAの切断. 「発生工学実験マニュアル」 (勝木元也編), 講談社サイエンティフィック, 東京, pp.141.
- Kimmel, C.B. and Warga, R.N., 1987; Cell lineages generating axial muscle in the zebrafish embryo. *Nature, Lond.*, 327, 234~237.
- Kingston, R.E., 1987; Harvest and assay for chloramphenicol acetyltransferase, in "Current protocols in molecular biology" (ed. by F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl), Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, pp.9.6.3-9.6.4
- Kollias, G., Wrighton, N., Hurst, J. and Grosveld, F., 1986; Regulated expression of human γ -, β -, and hybrid $\gamma\beta$ -globin genes in transgenic mice: Manipulation of the developmental expression patterns. *Cell*, 46, 89~94.
- Konkel, D.A., Tilghman, S.M. and Leder, P., 1978; The sequence of the chromosomal mouse β -globin major gene: Homologies in capping, splicing and Poly(A) sites. *Cell*, 15, 1125~1132.
- Kudo, S., 1980; Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. *Develop. Growth and Differ.*, 22, 403~414.
- Lacy, E., Roberts, F., Evans, E.P., Burtenshaw, M.D. and Costantini, F.D., 1983; A foreign β -globin gene in transgenic mice: Integration at abnormal chromosomal positions and expression in inappropriate tissues. *Cell*, 34, 343~358.
- Lawn, R.M., Efstratiadis, A., Connell, C.O. and Maniatis, T., 1980; The nucleotide sequence of the human β -globin gene. *Cell*, 21, 647~651.

- Lindenbaum and Grosveld, 1990; An in vitro globin gene switching model based on differentiated embryonic stem cells. *Genes Dev.*, 4, 2075~2081.
- Lin, S., Long, W., Chen, J. and Hopkins, N., 1992; Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4519~4523.
- Liu, Z., Moav, B., Faras, A.J., Guise, K.S., Kapuscinski, A.R. and Hackett, P.B., 1990a; Functional analysis of elements affecting expression of the β -actin gene of Carp. *Molec. Cell. Biol.*, 10, 3432~3440.
- Liu, Z., Moav, B., Faras, A.J., Guise, K.S., Kapuscinski, A.R. and Hackett, B., 1990b; Development of expression vectors for transgenic fish. *Bio/Technology*, 8, 1268~1272.
- Maclean, N., Penman, D. and Zhu, Z., 1987; Introduction of novel genes into fish. *Bio/Technology*, 5, 257~261.
- Maclean, N. and Penman, D., 1990; The application of gene manipulation to aquaculture. *Aquaculture*, 85, 1~20.
- McMahon, A.T., Flytzanis, C.N., Hough-Evans, B.R., Katela, K.S., Britten, R.J. and Davidson, E.H., 1985; Introduction of cloned DNA into sea urchin egg cytoplasm: Replication and persistence during embryogenesis. *Develop. Biol.*, 108, 420~430.
- McEvoy, T., Stack, M., Keane, B., Barry, T., Sreenan, J. and Gannon, F., 1988; The expression of a foreign gene in Salomon embryos. *Aquaculture*, 68, 27~37.
- 水上茂樹, 1977; ヘモグロビン. 「赤血球の生化学」東京大学出版, 東京, pp.7~22.
- Miwa, S. and Inui, Y., 1991; Thyroid hormone stimulation the shift of erythrocyte populations during metamorphosis of flounder. *J. Exp. Zool.*, 259, 222~228.

- 村松正實, 1988a; 泳動ゲルからのDNA断片の回収. 「ラボマニユアル遺伝子工学」(村松正實編), 丸善, 東京, pp.28.
- 村松正實, 1988b; コンピテント細胞の作成. 「ラボマニユアル遺伝子工学」(村松正實編), 丸善, 東京, pp.108~110.
- 村松正實, 1988c; プラスミドDNAの少量調整. 「ラボマニユアル遺伝子工学」(村松正實編), 丸善, 東京, pp.49~51.
- 村松正實, 1988d; プラスミドDNAの大量調整. 「ラボマニユアル遺伝子工学」(村松正實編), 丸善, 東京, pp.51~53.
- 村松正實, 1988e; CATアッセイによる転写調節の解析. 「ラボマニユアル遺伝子工学」(村松正實編), 丸善, 東京, pp.161~164.
- 村松正實, 1988f; 5'末端リン酸基の除去. 「ラボマニユアル遺伝子工学」(村松正實編), 丸善, 東京, pp.64.
- 村松 喬, 1989; トランスジェニックアニマルーその全体像. 「トランスジェニック・バイオロジー」(村松 喬・岩淵雅樹編), 講談社サイエンティフィック, 東京, pp.55~65.
- Nakano, E., 1956; Changes in the egg membrane of the fish egg during fertilization. *Embryologia*, 3, 89~103.
- Newport, J. and Kirschner, M., 1982a; A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell*, 30, 657~686.
- Newport, J. and Kirschner, M., 1982b; A major development transition in early *Xenopus* embryos: I. Control of the onset of transcription. *Cell*, 30, 687~696.
- Nobuta, K. and Aoki, T.; Cloning and complete nucleotide sequence of Carp α -globin gene. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 49~54.
- 帯刀益夫と井川洋二, 1981; グロビン遺伝子研究の現状. 蛋白質 核酸 酵素, 26, 291~297.

- Ohno, S., 1974; Animal cytogenetics. 4 Chordata 1. Protochordata, Cyclostomata and Pisces. (ed. by Bernard John), Gebruder Borntraeger, Berlin, pp.1~18.
- Ohtsuka, E., 1960; On the hardening of the chorion of the fish egg after fertilization. I. The mechanism of chorion hardening in Oryzias latipes. Biol. Bull., 118, 120~128.
- Okazaki, T., Misawa, J. and Shukuya, R., 1974; The effects of organic phosphates on the oxygen equilibria of two distinct hemoglobins of eel, Anguila japonica. Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 1031~1037
- Orkin, S.H., 1990; Globin gene regulation and switching: Circa 1990. Cell, 63, 665~672.
- Ozato, K., Kondoh, H., Inohara, H., Iwamatsu, T., Wakamatsu, Y. and Okada, T.S., 1986; Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken δ -crystallin gene in medaka embryos. Cell Differ., 19, 237~244.
- Ozato, K., Inoue, K. and Wakamatsu, Y., 1989; Transgenic fish: Biological and technical problems. Zool. Sci., 6, 445~457.
- Palmiter, R.D. and Brinster, R.L., 1986; Germ-line transformation of mice. Ann. Rev. Genet., 20, 465~499.
- Penman, D.J., Beeching, A.J., Penn, S. and Maclean, N., 1990; Factors affecting survival and integration following microinjection of novel DNA into Rainbow Trout eggs. Aquaculture, 85, 35~50.
- Perutz, M.F., 1969; The haemoglobin molecule. Proc. Roy. Soc. B. 173, 113~140.
- Perutz, M.F., 1983; Species adaptation in a protein molecule. Mol. Biol. Evol., 1, 1~28.

- Petruzzeli, R., Barra, D., Goffredo, B.M., Bossa, F., Coletta, M. and Brunori, M., 1984; Amino-acid sequence of β -chain of hemoglobin IV from trout (Salmo Irideus). *Biochem. Biophys. Acta.*, 789, 69~73.
- Rahman, M.A. and Maclean, N., 1992; Production of transgenic tilapia (Oreochromis niloticus) by one-cell-stage microinjection. *Aquaculture*, 219~232.
- Rodewald, K. and Braunitzer, G., 1984a; Die primarstruktur des hamoglobins vom Goldfish (Carassius auratus). *Hoppe-Seyler'sZ. physiol.chem. Bd.*, 365, 95~104.
- Rodewald, K., Stangl, A. and Braunitzer, G., 1984b; Primary structure, biochemical and physiological aspects of hemoglobin from south American Lungfish (lepidosiren paradoxus, Dipnoi). *Hoppe-Seyler'sZ. physiol.chem.*, 365, 639~649.
- Rokkones, E., Alestrom, P., Skjewvold, H. and Gautvik, K.M., 1989; Microinjection and expression of a mouse metallothionein human growth hormone fusion gene in fertilized salmonid eggs. *J. Comp. physiol. B*, 158, 751~758.
- Rusconi, S. and Schaffner, W., 1981; Transformation of frog embryos with a rabbit β -globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 5051~5055.
- Ryan, T.M., Behringer, R.R., Townes, T.M., Palmiter, R.D. and Brinster R.L., 1989; High-level erythroid expression of human α -globin genes in transgenic mice. *Nuc. Acids. Res.*, 86, 37~41.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N., 1985; Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350~1354.

- Saiki, R.K., 1988; The design and optimization of the PCR, in "PCR technology" (ed. by H.A. Erlich) M stockton press, New York, pp. 7~22
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989; Capillary transfer of DNA to nylon membranes under neutral conditions, in "Molecular cloning" (ed. by Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 9.44.
- Sato, N., Watanabe, K., Murata, K., Sakaguchi, M., Kariya, Y., Kimura, S., Nonaka, M. and Kimura, A., 1988; Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA. *Biochem. Biophys. Acta.*, 949, 35~42.
- 瀬野悍二, 鮎沢 大, 1989; チミジン要求性変異株の分離. *実験医学*, 7, 1464~1468.
- Shimada, T., Okihama, Y., Okazaki, T. and Shukuya, R., 1980; The multiple hemoglobins of the Japanese eel, Anguilla japonica. *J. Biol. Chem.*, 255, 16, 7912~7917.
- Spradling, A.C. and Rubin, G.M., 1982; Transposition of cloned P-elements into Drosophila germ line chromosomes. *Science*, 218, 341~347.
- Stinchcomb, D.T., Shaw, J.E., Carr, S.H. and Hirsh, D., 1985; Extrachromosomal DNA transformation of Caenorhabditis elegans. *Molec. Cell. Biol.*, 5, 3484~3496.
- Stuart, G.W., McMurray, J.V. and Westerfield, M., 1988; Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development*, 103, 403~412.
- Stuart, G.W., Vielkind, J.R., McMurray, J.V. and Westerfield, M., 1990; Stable lines of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgene expression. *Development*, 109, 577~584.

- 隆島史夫, 1982a; 種苗生産: 精液の良否判定. 「淡水養殖技術」(野村稔編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.110~111.
- 隆島史夫, 1982b; 繁殖の生理: 卵膜硬化. 「淡水養殖技術」(野村稔編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.35~36.
- Takebe, Y., Seiki, M., Fujiyama, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M. and Arai, N., 1988; SR α promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression and the R-U5 segment of human T-Cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Molec. cell. Biol.*, 466~472.
- Takeshita, S., Aoki, T., Fukumaki, Y. and Takagi, Y., 1984; Cloning and sequence analysis of a cDNA for the α -globin mRNA of carp, *Cyprinus carpio*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 783, 265~271.
- Tamiya, E., Sugiyama, T., Masaki, K., Hirose, A., Okashi, T. and Karube I., 1990; Spatial imaging of luciferase gene expression in transgenic fish. *Nuc. Acids. Res.*, 18, 1072.
- 田代文男, 1972; ニジマス^ニの成熟に及ぼす γ 線の影響について 日水誌, 38, 793~797.
- Townes, T.M., Lingrel, J.B., Chen, H.Y., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D., 1985; Erythroid-specific expression of human β -globin genes in transgenic mice. *EMBO J.*, 4, 1715~1723.
- Tuan, D., Solomon, W., Li, Q. and London, I.M., 1985; The " β -like-globin" gene domain in erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 6384~6388.
- Vanstone, W.E., Roberts, E. and Tsuyuki, H., 1964; Changes in the multiple hemoglobin patterns of some pacific salmon, genus *Oncorhynchus*, during the parr-smolt transformation. *Can. J. Phys. pharmac.*, 42, 697~703.
- 若松祐子, 木下政人, 豊原治彦, 坂口守彦, 岩松鷹司, 田口保子, 富田英夫, 尾里健二郎, 1992; 魚類の胚操作—キメラメダカー—. 第1回マリンバイオテクノロジー研究発表会講演要旨集, 609A.

- Westman, K., 1970; Hemoglobin polymorphism and its ontogeny in sea-running and landlocked Atlantic salmon (Salmo salar L.). Ann. Acad. Sci. fenn. A. IV. Biologica, 170, 1~28.
- Williams, J.W., Kay, R.M. and Patient, R.K., 1980; The nucleotide sequence of the major β -globin mRNA from Xenopus laevis. Nuc. Acid. Res, 8, 4247~4258.
- Winkler, C., Vielkind, J.R. and Scharf, M., 1991; Transient expression of foreign DNA during embryonic and larval development of the medaka fish (Oryzias latipes). Mol. Gen. Genet., (in press).
- 山口勝巳, 河内山義夫, 橋本周久, 松浦文雄, 1962; ウナギの多成分系ヘモグロビンに関する研究—II—. 日水誌, 28, 192~200.
- 山口勝巳, 河内山義夫, 橋本周久, 松浦文雄, 1963; ドジョウの2成分系ヘモグロビンに関する研究—II—. 日水誌, 29, 180~188.
- Yamaha, E., Usui, K., Onozato, H. and Hamada, K., 1988; A method for dechoriation in goldfish (Carassius auratus). Nippon Suisan Gakkaishi, 52, 1929~1934.
- 山羽悦郎, 山崎文雄, 1992; キンギョ卵細胞への電気融合法の適用について. 平成4年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 536.
- 山村研一, 1989; DNA注入法による疾患モデルの作製. 「トランスジェニックバイオロジー」(村松 喬, 岩淵正樹編), 講談社サイエンティフィック, 東京, pp127~143.
- Yamanaka, H., Yamaguchi, K., Hashimoto, K. and Matsuura, F., 1967; Starch-gel electrophoresis of fish hemoglobins-III. Salmonid fishes. Nippon Suisan Gakkaishi, 33, 195~203.
- Yamamoto, 1939; Changes of the cortical layer of the egg of Oryzias latipes at the time of fertilization. Proc. Imp. Acad., 15, 269~271

- Yoon, S.J., Hallerman, E.M., Gross, M.L., Jiu, Z., Schneider, J.F., Faras, A.J., Hackett, P.B., Kapuscinski, A.R. and Guise, K.S., 1990; Transfer of the gene for neomycin resistance into goldfish, Carassius auratus. *Aquaculture*, 85, 21~33.
- 吉崎悟朗, 尾城 隆, 隆島史夫, 1989; 魚卵へのマイクロインジェクションのための卵膜効果抑制ならびに除去. *日水誌*, 55, 396.
- Yoshizaki, G., Oshiro, T. and Takashima, F., 1991; Introduction of carp α -globin gene into rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 819~824.
- Zafarullah, M., Bonham, K. and Gedamu, L., 1988; Structure of the rainbow trout metallothionein B gene and characterization of its metal-responsive region. *Mol. Cell. Biol.*, 8, 4469~4476.
- Zafarullah, M., Olsson, P.E. and Gedamu, L., 1989; Endogenous and heavy-metal-ion-induced metallothionein gene expression in salmonid tissues and cell lines. *Gene*, 83, 85~93.
- Zhang, P., Hayat, M., Joyce, C., Gonzales-villasenor, L.I., Lin, C.M., Dunham, R.A., Chen, T.T. and Powers, D.A., 1990; Gene transfer, Expression and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH cDNA in the common carp, Cyprinus carpio (Linnaeus). *Molec. Reproduc. Develop.*, 25, 3~13.
- Zhu, Z., Li, G., He, L. and Chen, S., 1985; Novel gene transfer into the fertilized eggs of fish (Carassius auratus L. 1758). *Z. angew. Ichthyol.*, 1, 31~34.
- Zhu, Z., Kesheng, X., Guohua, L., Yuereng, X. and Ling, H., 1986; Biological effects of human growth hormone gene microinjected into the fertilized eggs of loach Misgurnus anguillicaudatus (Cantor). *Kexue Tongbao*, 31, 988~990.

溶液組成一覧

LB培地

1%トリプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%NaCl

Lysis buffer

50mM Tris.HCl(pH8.0)、0.1M 塩化ナトリウム、20mM EDTA、1% SDS

PCR buffer

50mM塩化カリウム、10mM Tris.HCl(pH8.3)、1.5mM 塩化マグネシウム、
0.001%ゼラチン

PEG

20% ポリエチレングリコール、2.5M 塩化ナトリウム

Proteinase digestion buffer

0.2M Tris.Cl(pH8.0)、25mM EDTA(pH8.0)、0.3M 塩化ナトリウム、
2% SDS

RNA extraction buffer

0.14M 塩化ナトリウム、1.5mM 塩化マグネシウム、10mM Tris.Cl(pH8.6)
1mM dithiothreitol

RNA running buffer (5×)

0.1M MOPS(pH7.0)、40mM 酢酸ナトリウム、5mM EDTA(pH8.0)

RNase A

RNase Aを10mg/mlになるように10mM Tris.Cl(pH 7.5)、15mM 塩化ナト
リウム溶液に溶解後、100℃で15分間処理し、DNaseを失活させる。

SSC (20×)

3M 塩化ナトリウム、0.3M クエン酸3ナトリウム2水和物(pH7.0)

SSPE (20×)

3M 塩化ナトリウム、0.2M リン酸ナトリウム、20mM EDTA(pH7.4)

TBE (5×)

0.45M Tris、0.45M ホウ酸、10mM EDTA

TE

10mM Tris、1mM EDTA(pH8.0)

TE-フェノール

フェノールを60°Cで溶解した後、0.1%になるようにキノリノールを溶解する。その後、フェノールと等量のTEでフェノールを飽和させる。

シークエンスゲル用固定液

10%酢酸、10%メタノール

淡水魚用リングル液

0.75%塩化ナトリウム、0.02%塩化カリウム、0.02%塩化カルシウム

ニジマス用リングル液

0.9%塩化ナトリウム、0.024%塩化カリウム、0.026%塩化カルシウム

ポリアクリルアミドゲル（シーケンシング用）

40%アクリルアミド*4.5ml、5×TBE6ml、尿素15gを混合後、蒸留水で30mlまでメスアップし、使用直前に過硫酸アンモニウム32mg、TEMEDを15μl加える。

*40%アクリルアミド；38%アクリルアミド、2%N,N'-メチレンビスアクリルアミド

ホルムアルデヒドゲル

1×RNA running buffer、2.2Mホルムアルデヒド、1.0%アガロース

図の説明

図1-1 ; ニジマス卵へのマイクロインジェクション

B ; 胚盤 M ; マイクロピペット S ; 針金の輪

図1-2 ; ニジマス卵へのマイクロインジェクションの模式図

B ; 胚盤 I ; ニジマス用等調液 M ; マイクロピペット S ; 針金の輪

図2-1 ; pRSVCATの作製法

B ; Bam HI, H ; Hind III, N ; Nsi I, P ; Pst I, S ; スプライシングシグナル, A ; ポリA付加シグナル, PL ; ポリリンカー

図2-2 ; pRSVtGHの作製法

H ; Hind III, N ; Nru I, P ; Pvu II

図2-3 ; RSVCATおよびRSVtGHの模式図

図2-4 ; RSVCATをマイクロインジェクションした個体の卵より抽出したDNA

をHinc II、Hind IIIによって消化した後に行ったサザンブロット解析の結果（上）およびマイクロインジェクションに用いたDNA断片の制限酵素地図（下）

B ; Bam HI, C ; Hinc II, D ; Hind III, N ; Nru I

図2-5 ; RSVtGHをマイクロインジェクションした個体より抽出したDNAを

Eco RI消化後に行ったサザンブロット解析の結果（上）およびマイクロインジェクションに用いたDNA断片の制限酵素地図（下）

図2-6 ; RSVCAT導入個体のDNAをHind III消化後に行ったサザンブロット解析の結果およびRSVCATが種々のコンカテマーを形成した際の模式図

P ; RSVCATを30pg用いたポジティブコントロール

図2-7 ; RSVCAT導入個体のDNAを未消化およびPst I消化後に行ったサザンブロット解析の結果。下段はRSVCATが宿主の染色体に組み込まれた場合と組み込まれなかった場合の模式図

図2-8 ; pSV2CATの模式図

B ; Bam HI, P ; Pst I, S ; スプライシングシグナル, A ; ポリA付加シグナル

- 図2-9 ; 外来遺伝子をマイクロインジェクションしたニジマス初期胚における外来遺伝子量の変化
32 ; 32細胞期, M ; 桑実胚期, B ; 胞胚期, G ; 囊胚期, 12 ; 12日胚期,
E ; 発眼期, H ; 孵化期
- 図2-10 ; 精子へのエレクトロポレーションにより pSV2CATを導入した個体のDNAを用いたサザンブロット解析の結果
- 図3-1 ; PCR法に用いたプライマーの位置とその配列
- 図3-2 ; 約1年で成熟したC α G導入ニジマス
- 図3-3 ; C α G導入ニジマスより採取した精子のDNAをPCR法により解析した結果
- 図3-4 ; C α G導入ニジマスより採取した精子の未消化DNAを用いて行ったサザンブロット解析の結果
- 図3-5 ; 3151の精子を用いて作出したF1より抽出したDNAを鋳型に用いたPCR解析の結果
- 図3-6 ; C α Gの伝達が確認されたF1より抽出した未消化DNAを用いて行ったサザンブロット解析の結果。
P ; 3151のDNAを用いた区
- 図3-7 ; C α Gの伝達を確認されたF1より抽出したDNAをPst I消化後に行ったサザンブロット解析の結果。下段はC α Gがコンカテマーを形成した際の模式図
P ; 3151のDNAを用いた区
- 図3-8 ; 3151由来のF1の精子を用いて作製したF2より抽出したDNAを、Pst I消化後に行ったサザンブロット解析の結果

図3-9 ; 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された外来遺伝子が宿主染色体中へ組み込まれる過程の模式図

白 ; 外来遺伝子が宿主の染色体に組み込まれていないゲノム

黒 ; 外来遺伝子が宿主の染色体にhead-to-tailおよびtail-to-tail-コンカテマーを形成して組み込まれているゲノム (図3-7の1, 12, 21, 24, 28, 29)

斜線 ; 外来遺伝子が宿主の染色体にhead-to-head、tail-to-tail、およびhead-to-tailのコンカテマーを形成して組み込まれているゲノム (図3-7の16)

図4-1 ; RSVCATおよびpSV2CAT導入ニジマスの初期胚における外来遺伝子の発現量の変動

32 ; 32細胞期, M ; 桑実胚期, B ; 胞胚期, G ; 囊胚期, 12 ; 12日胚期, E ; 発眼期, H ; 孵化期

図4-2 ; RSVCAT導入ニジマス初期胚における外来遺伝子量の変化とその発現量の変化

32 ; 32細胞期, M ; 桑実胚期, B ; 胞胚期, G ; 囊胚期, 12 ; 12日胚期, E ; 発眼期, H ; 孵化期

図4-3 ; pSV2CAT導入ニジマス初期胚における外来遺伝子量の変化とその発現量の変化

32 ; 32細胞期, M ; 桑実胚期, B ; 胞胚期, G ; 囊胚期, 12 ; 12日胚期, E ; 発眼期, H ; 孵化期

図4-4 ; RSVCATをマイクロインジェクションした後のニジマス70日胚における外来遺伝子の発現

CM ; クロラムフェニコール, Ac-CM ; アセチル化されたクロラムフェニコール

図4-5 ; RSVCAT導入ニジマスF1での外来遺伝子の発現

CM ; クロラムフェニコール, Ac-CM ; アセチル化されたクロラムフェニコール

図4-6 ; ニジマスメタロチオネインAプロモーター領域のPCR法による増幅
に用いたプライマーの位置とその配列

● ; TATA box, ○ ; 金属応答領域

※ () 内の数字は転写開始点を0にしたときの切断位置

図4-7 ; 受精後15日および32日胚における外来遺伝子の発現量

MT ; ニジマスメタロチオネインAプロモーター使用区

pSV2 ; SV40プロモーター、エンハンサー使用区

RSV ; RSVのLTR使用区 pSR α ; ヒトT細胞白血病ウイルス遺伝子のプロモーター使用区

図5-1 ; マイクロインジェクションに用いたコイ α -グロビン遺伝子群

太線 ; エキソン 細線 ; 5' 上流域, イントロン, 3' 下流域

図5-2 ; C α G導入ニジマスの血球全RNAを用いて行ったノーザンブロット解析の結果

図5-3 ; pC α GCATの作出法

SS ; スプライシングシグナル PA ; ポリA付加シグナル 5' up st. ; 5' 上流域

図5-4 ; C α G3-CATおよびC α G4-CAT導入ニジマスにおける外来遺伝子の発現量の変化

図5-5 ; C α G3-CAT導入ニジマス10日胚における各組織毎の外来遺伝子の発現量

T ; 全胚体、H ; 頭部、I ; 躯幹部、M ; 尾部筋肉、Y ; 卵黄嚢

図5-6 ; C α G3-CAT導入ニジマス20日胚における各組織毎の外来遺伝子の発現量

T ; 全胚体、B ; 血球、H ; 頭部、I ; 躯幹部、M ; 尾部筋肉、Y ; 卵黄嚢

図5-7 ; C α G3-CAT導入ニジマス30日胚における各組織毎の外来遺伝子の発現量

T ; 全胚体、B ; 血球、H ; 頭部、I ; 躯幹部、M ; 尾部筋肉、Y ; 卵黄嚢

図5-8 ; C α G4-CAT導入ニジマス10日胚における各組織毎の外来遺伝子の発現量

T ; 全胚体、H ; 頭部、I ; 躯幹部、M ; 尾部筋肉、Y ; 卵黄嚢

図5-9 ; C α G4-CAT導入ニジマス20日胚における各組織毎の外来遺伝子の発現量

T ; 全胚体、B ; 血球、H ; 頭部、I ; 躯幹部、M ; 尾部筋肉、Y ; 卵黄囊

図5-10 ; C α G4-CAT導入ニジマス30日胚における各組織毎の外来遺伝子の発現量

T ; 全胚体、B ; 血球、H ; 頭部、I ; 躯幹部、M ; 尾部筋肉、Y ; 卵黄囊

図5-11 ; コイ β -グロビンアミノ酸配列から推測し、PCR法に用いたミックスプライマーの位置と配列

図5-12 ; コイ β -グロビンcDNAの塩基配列

ATG ; 開始コドン、TAG ; 終止コドン、~~AAATAAA~~ ; ポリA付加シグナル

AAA poly A ; ポリA、* ; ギャップ、- ; 未決定の塩基

図5-13 ; コイ β -グロビンアミノ酸配列

図5-14 ; ヒト β -グロビンとコイ β -グロビンのアミノ酸配列の比較

* ; ヒトとコイで同じアミノ酸が用いられている残基

下線 ; α β サブユニット間で接触しているアミノ酸

下線 ; α 1 β 2接触をしているアミノ酸

網かけ ; ヘムと接触しているアミノ酸

網かけ ; 近位ヒスチジンおよび遠位ヒスチジン

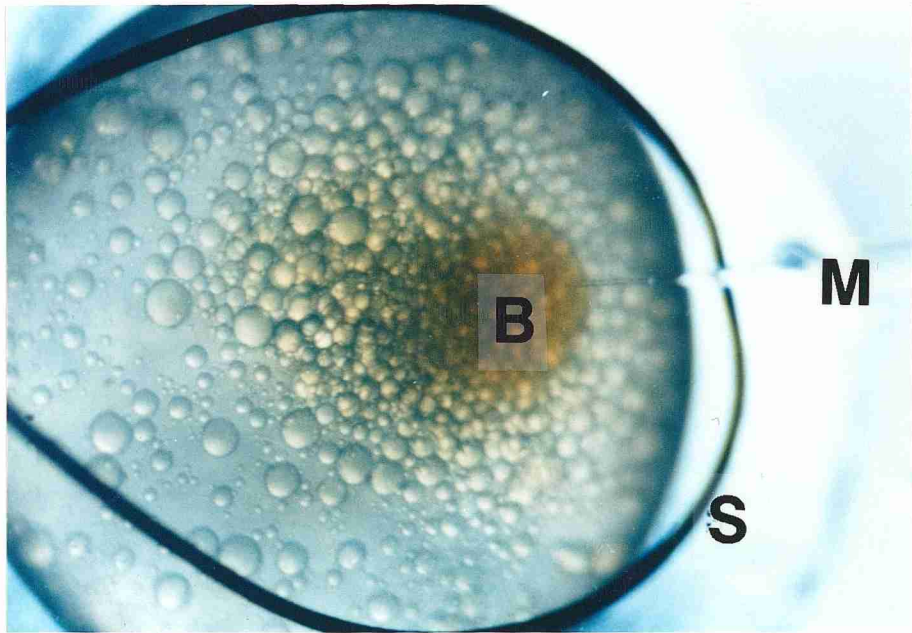


Fig.1-1

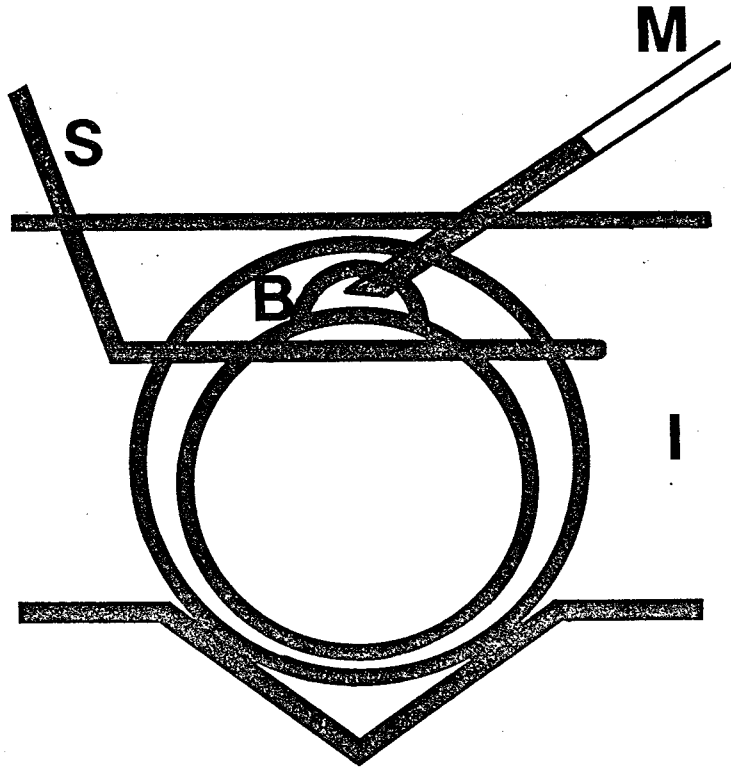


Fig. 1-2

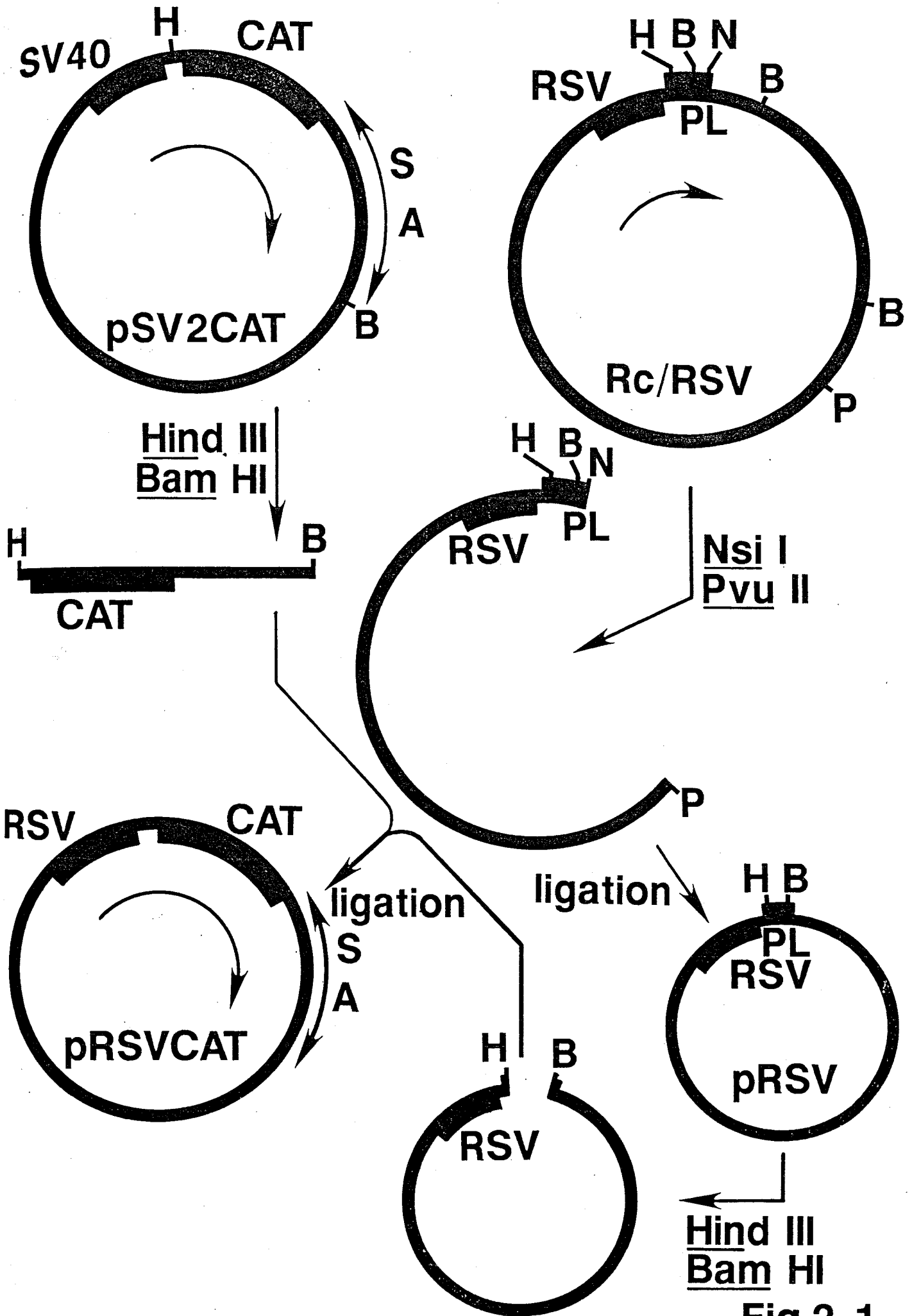


Fig.2-1

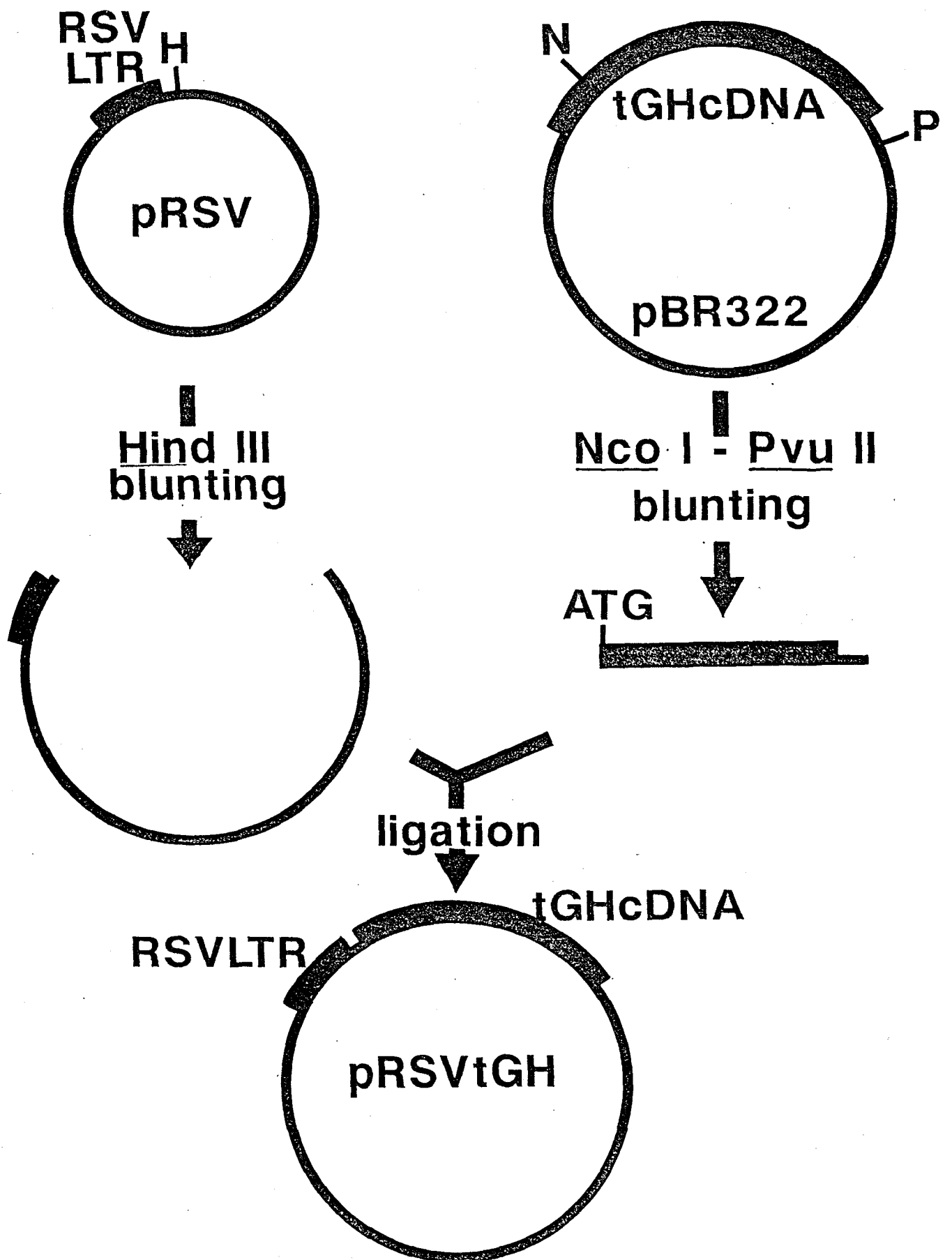


Fig.2-2

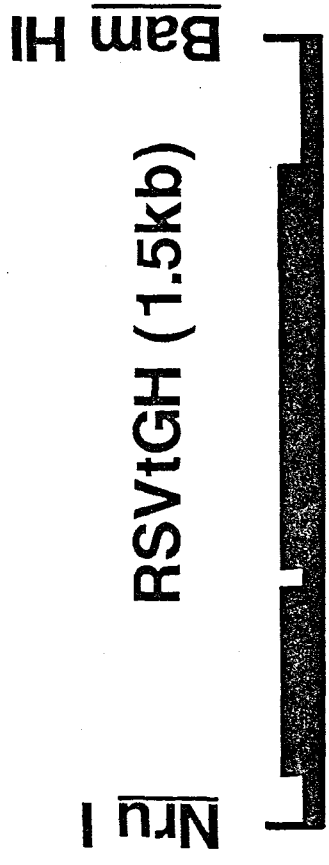


Fig.2-3

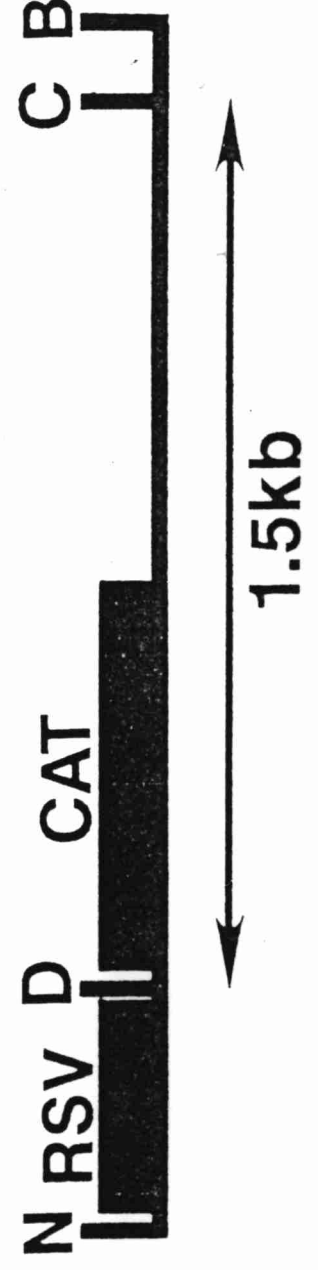
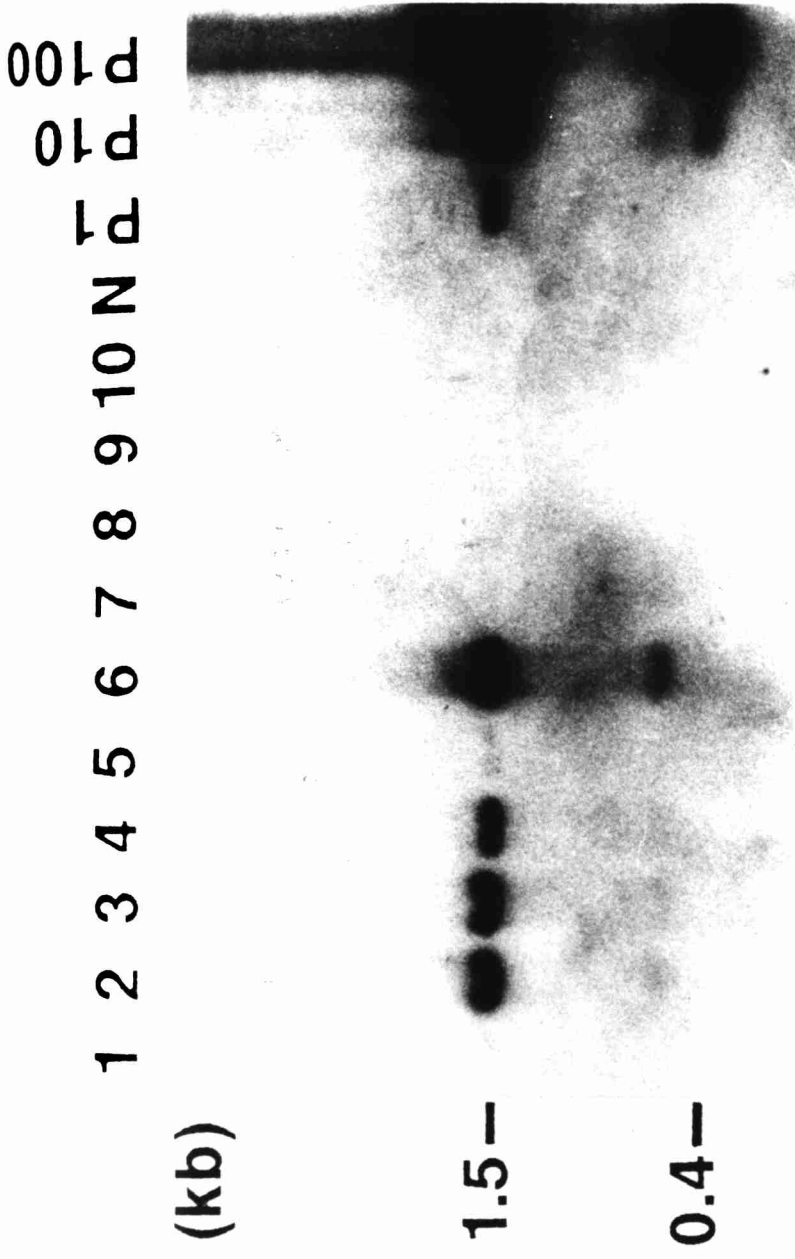
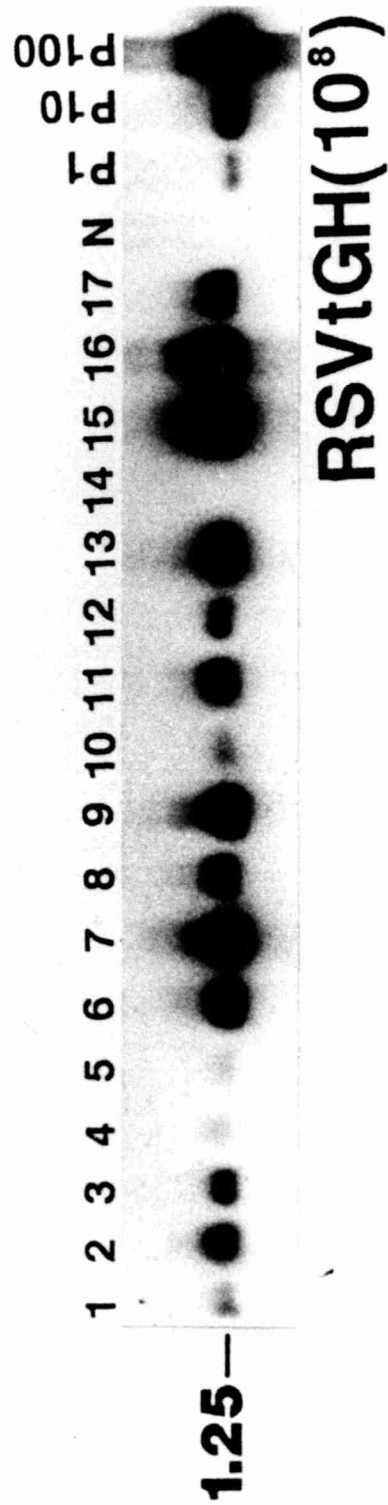
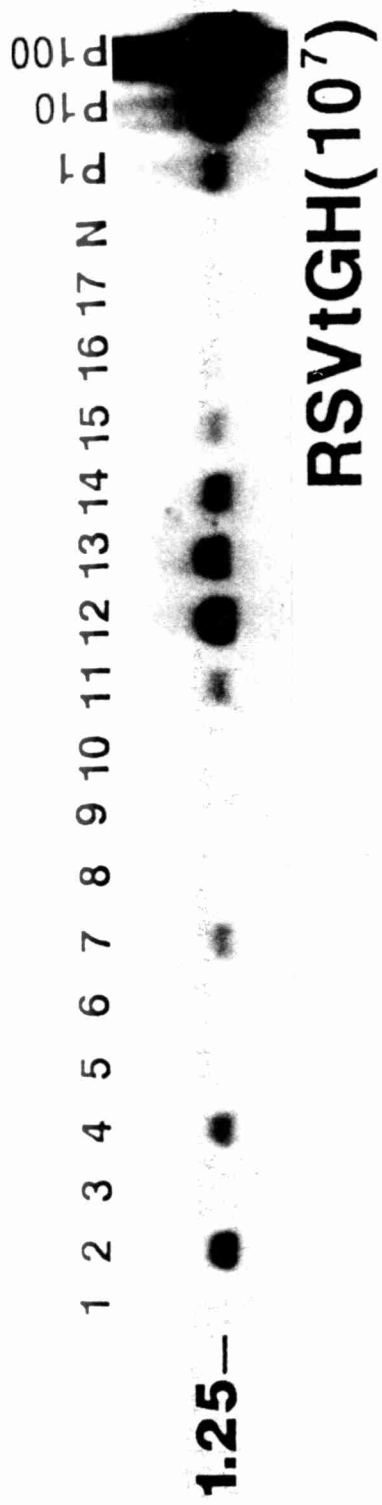


Fig.2-4



← 1.25Kb →

Fig.2-5

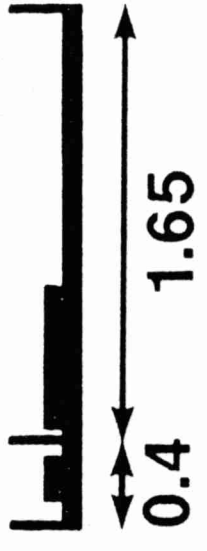
1 2 3 4 5 6 P

(kb)

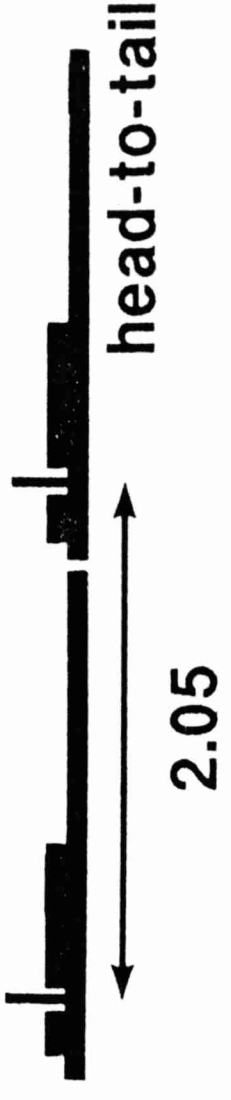
3.3 —
2.05 —
1.65 —

0.4 —

Nru I Hind III Bam HI



Hind III Hind III



Hind III

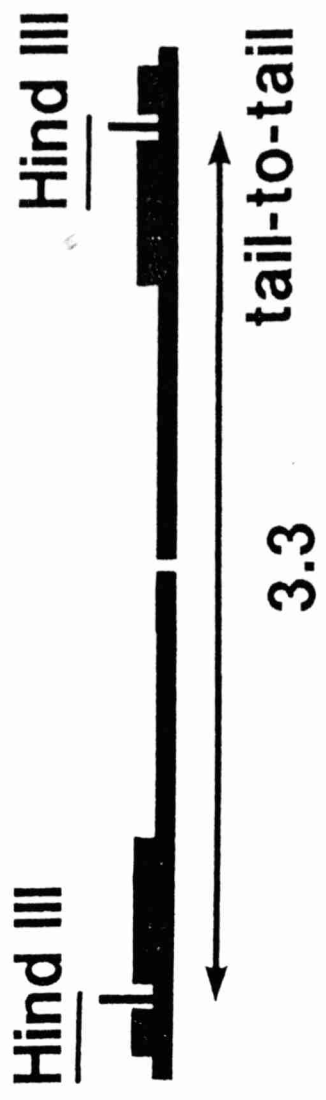


Fig.2-6

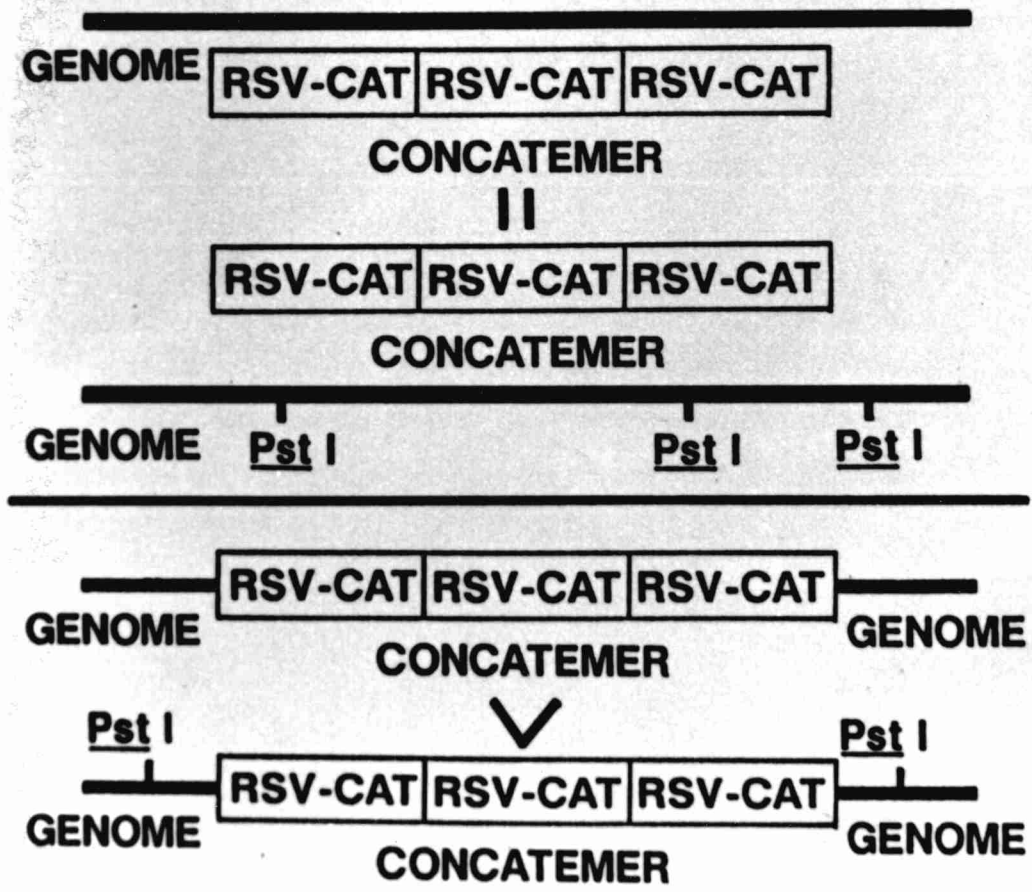
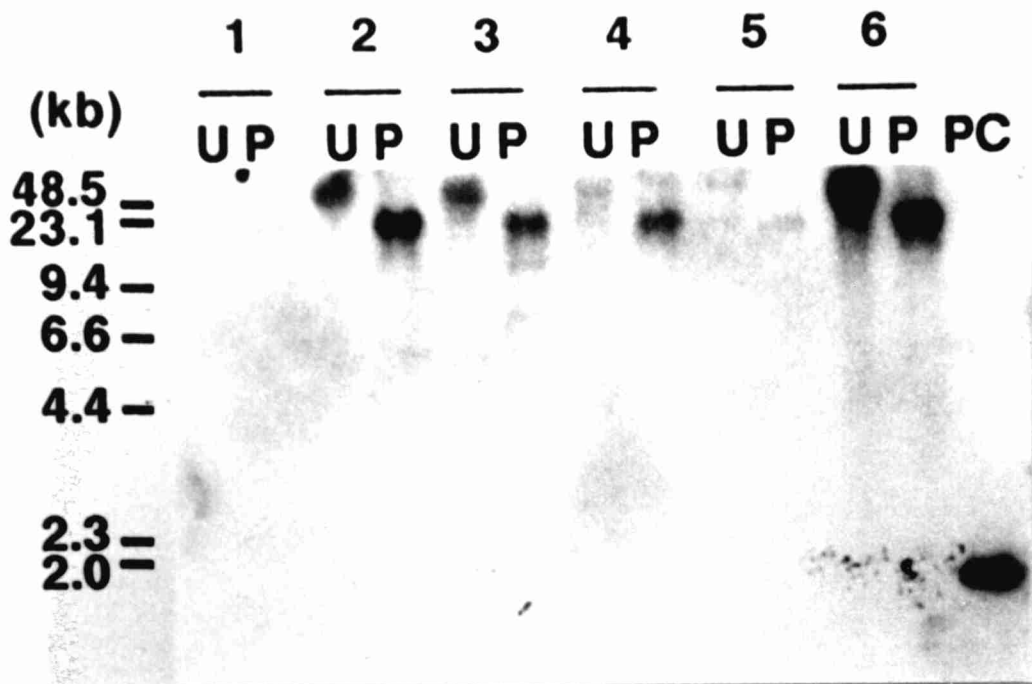


Fig.2-7

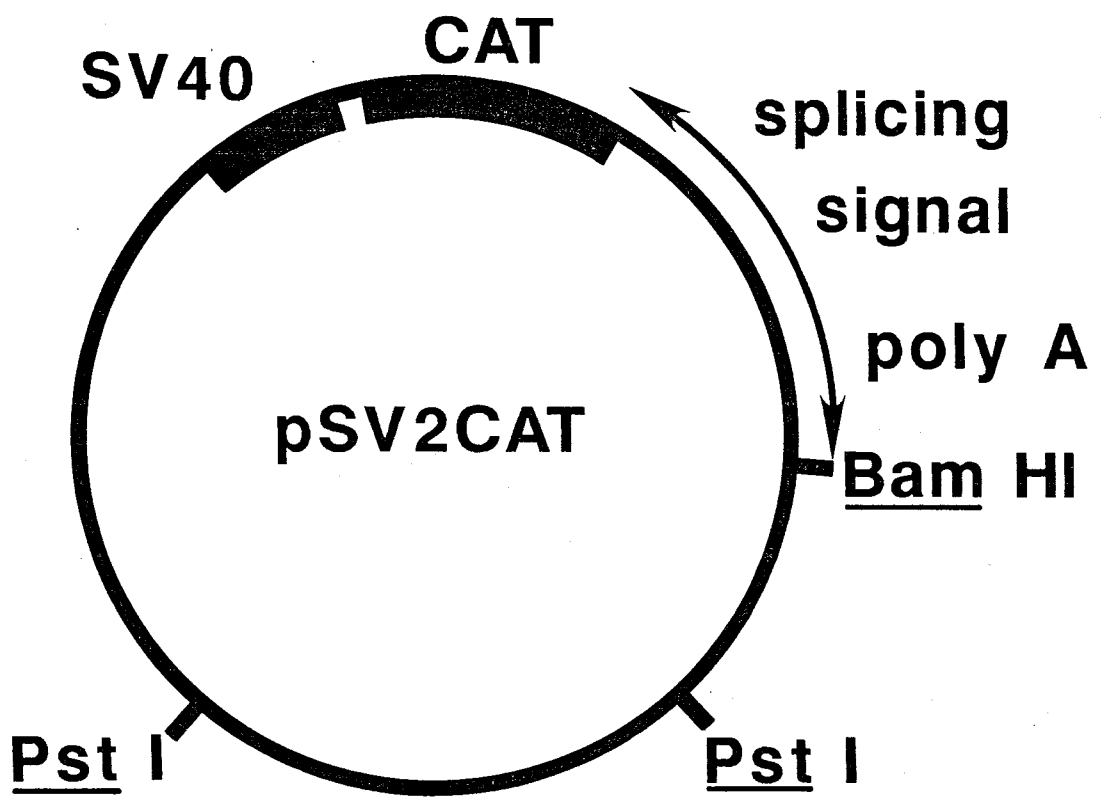


Fig.2-8

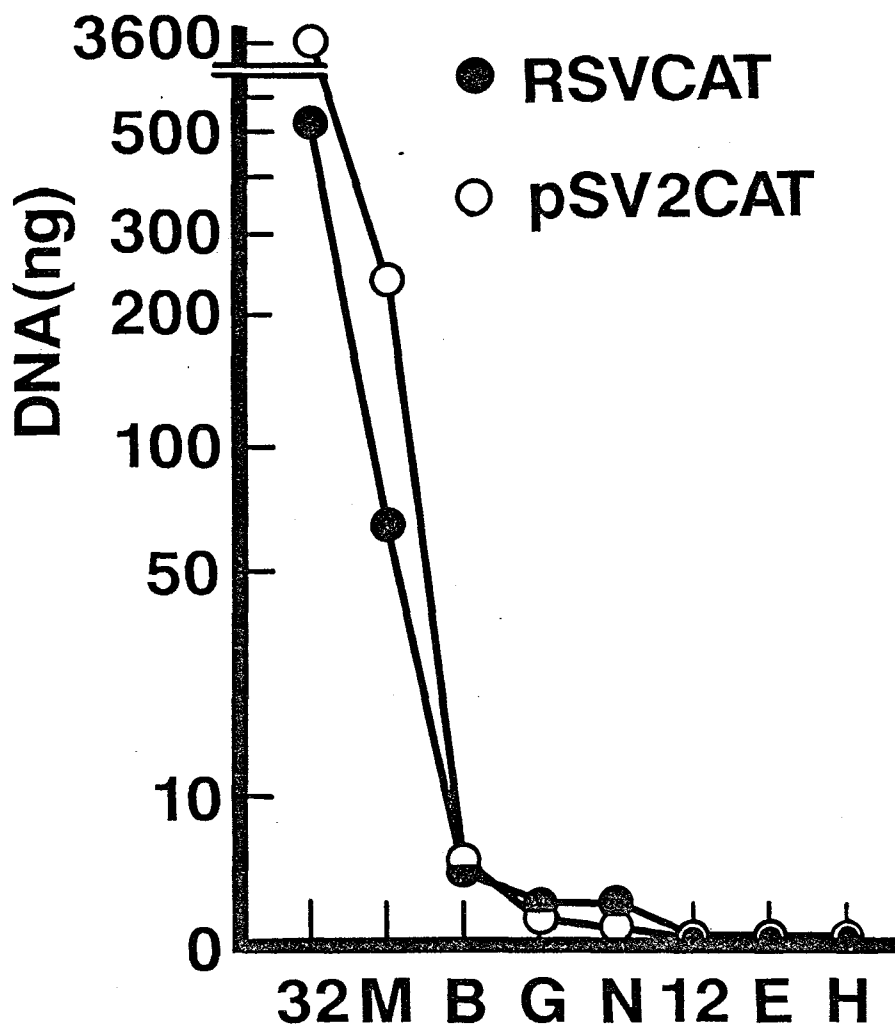


Fig.2-9

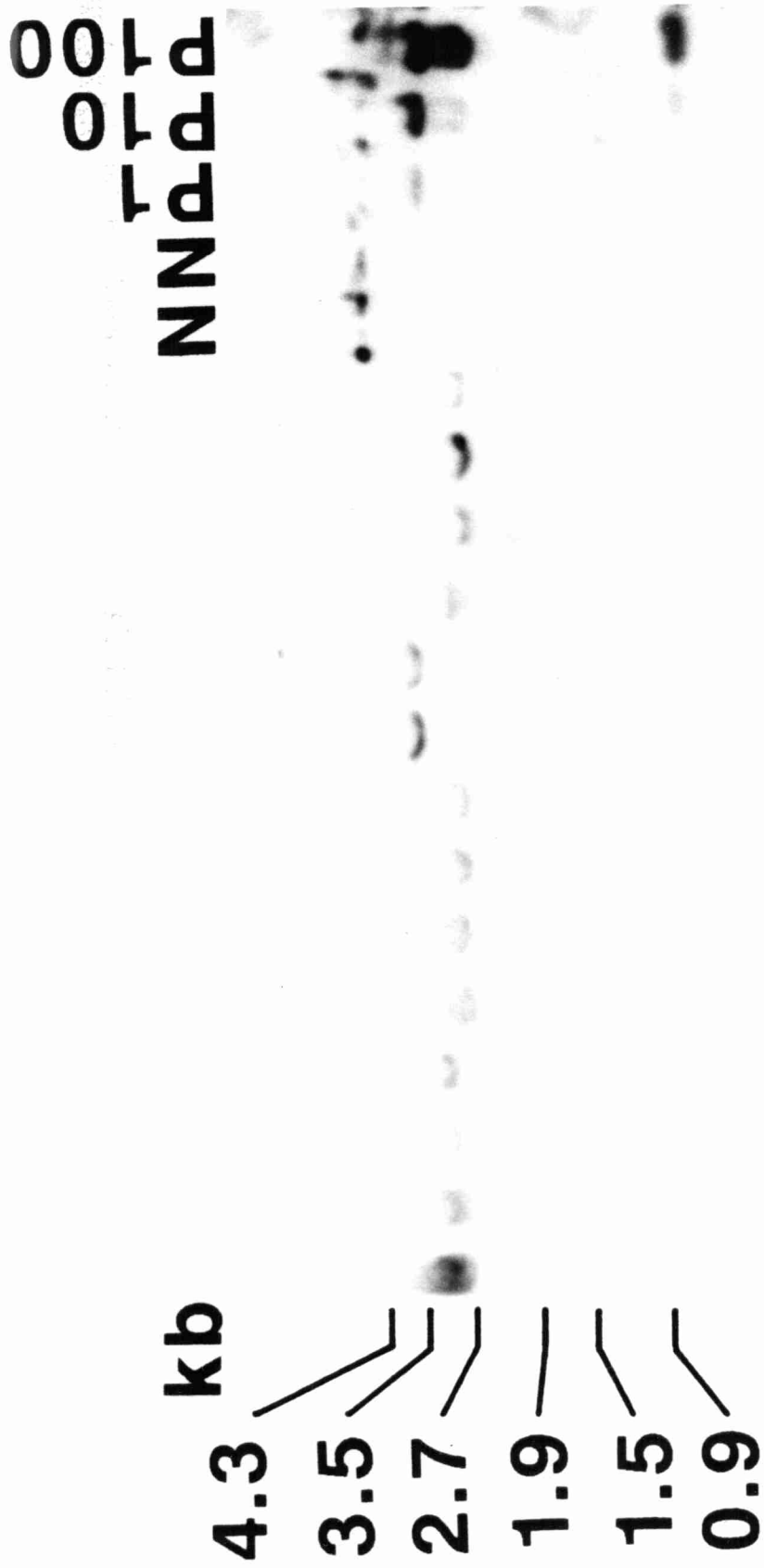


Fig.2-10

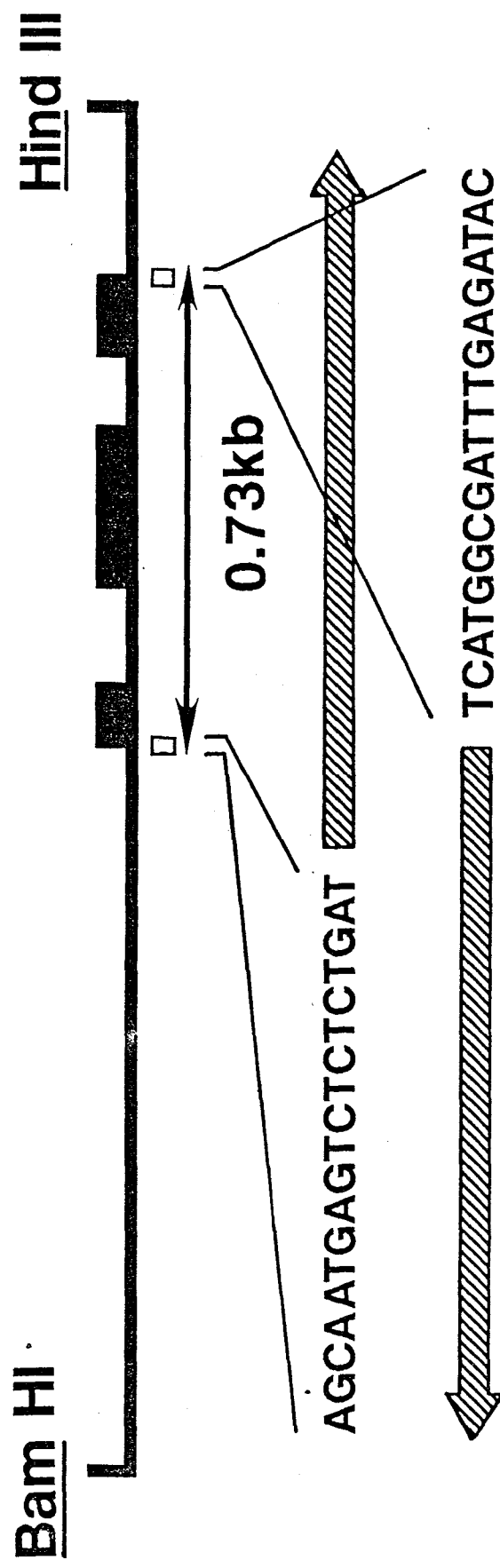


Fig.3-1

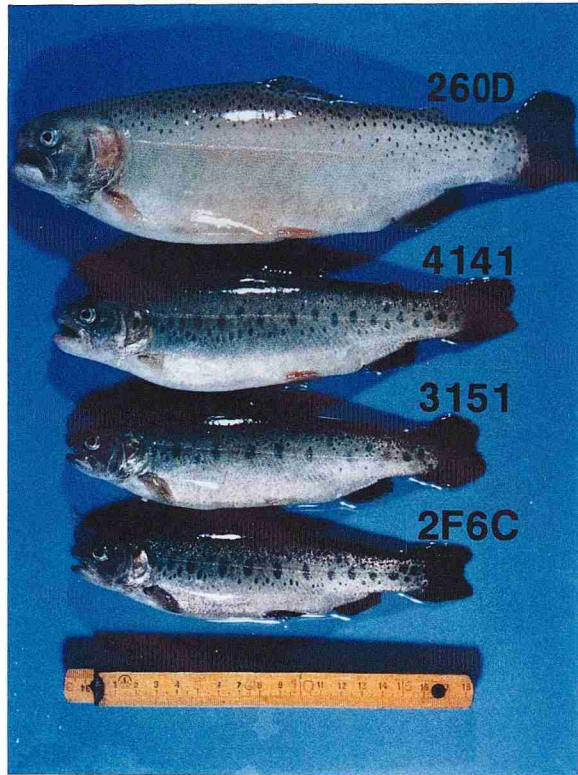


Fig.3-2

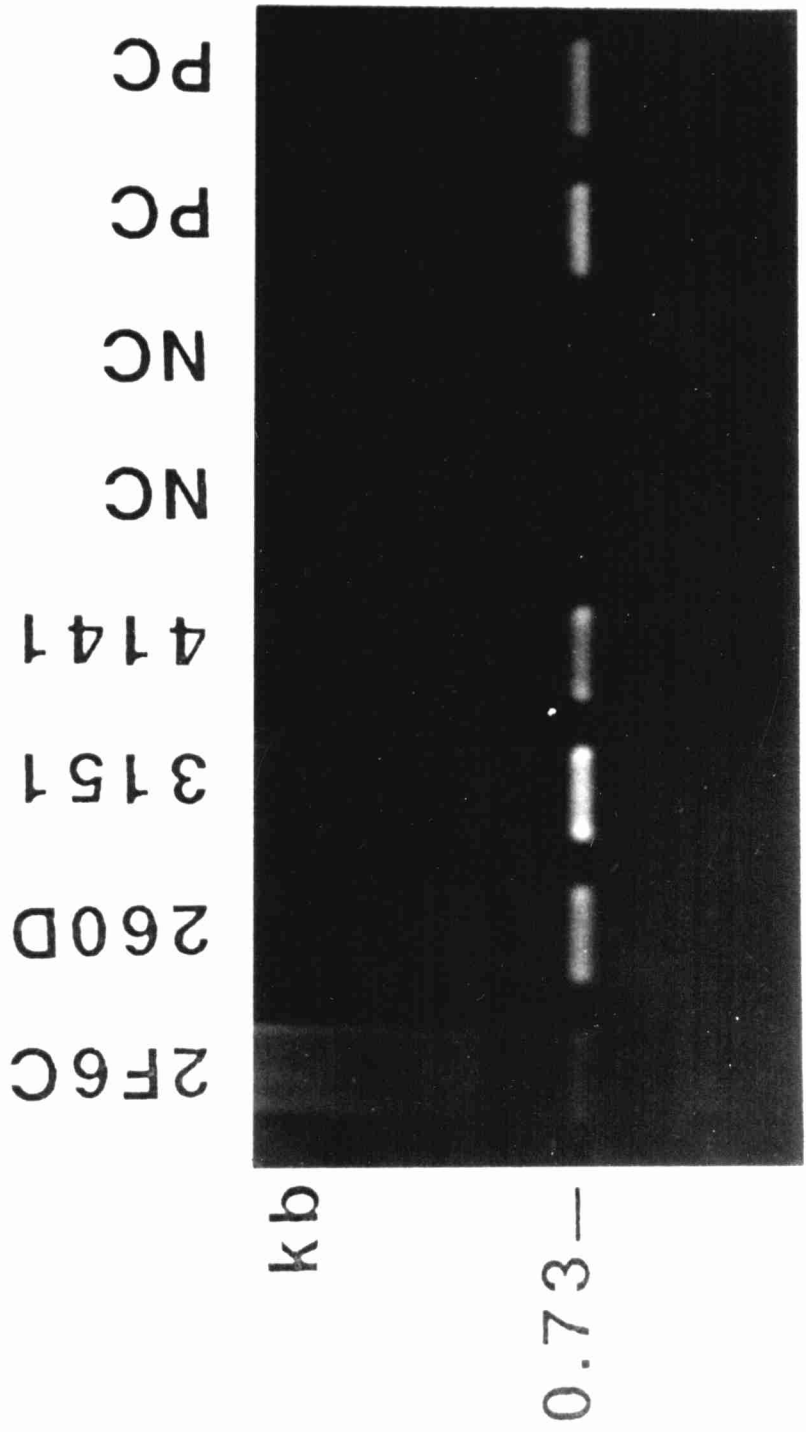


Fig.3-3

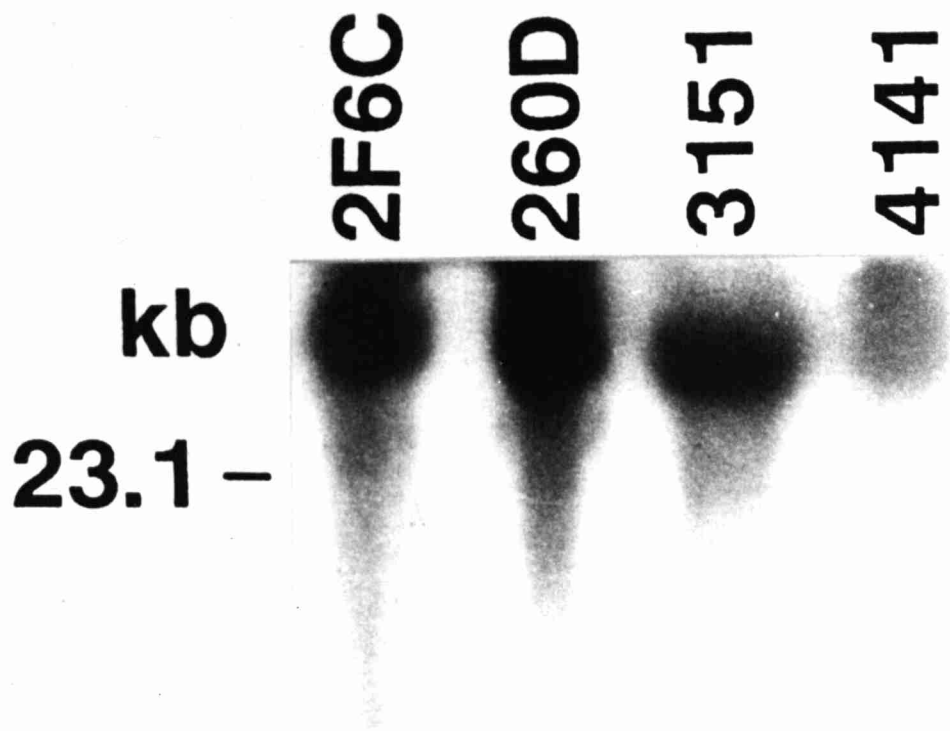


Fig.3-4

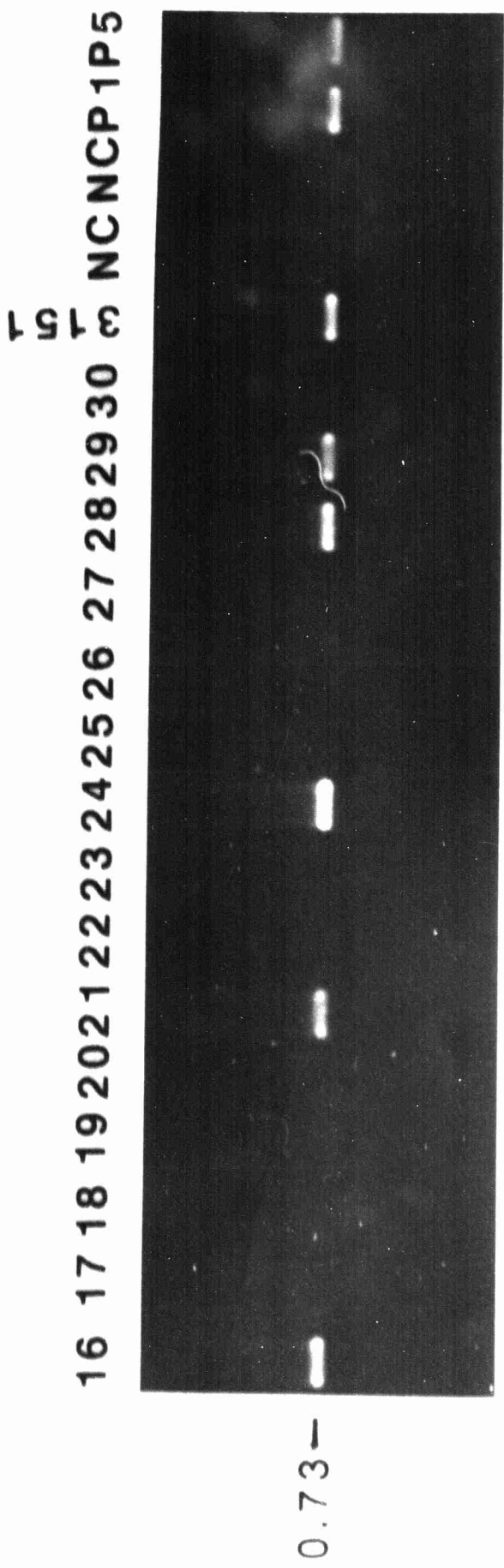
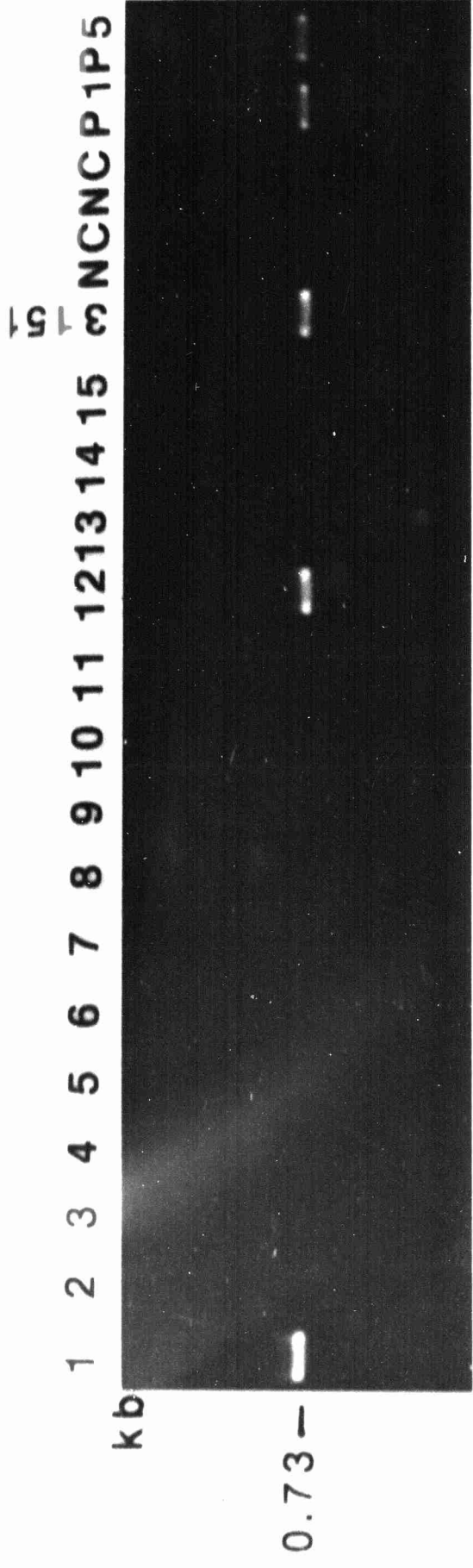


Fig.3-5

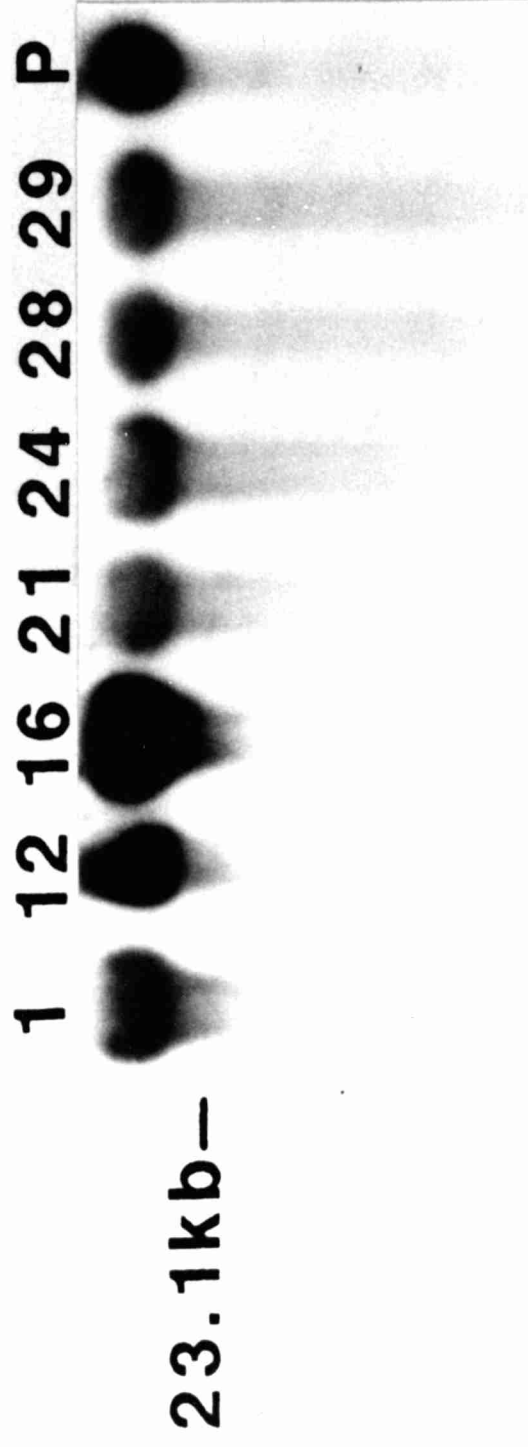


Fig.3-6

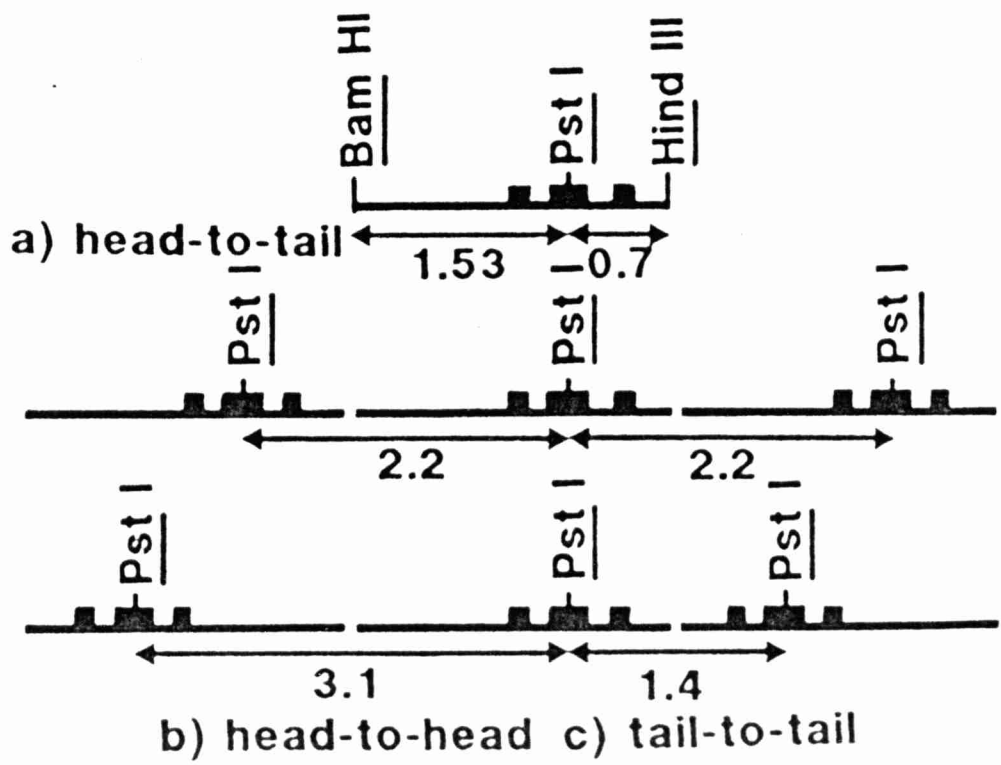
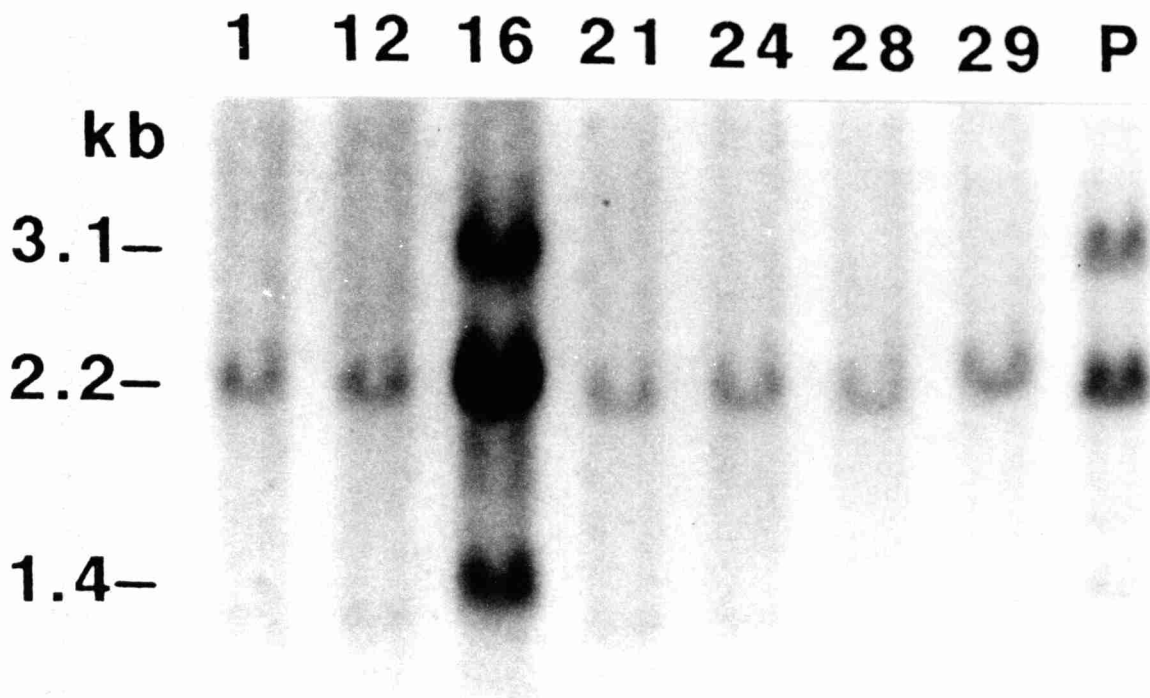


Fig.3-7

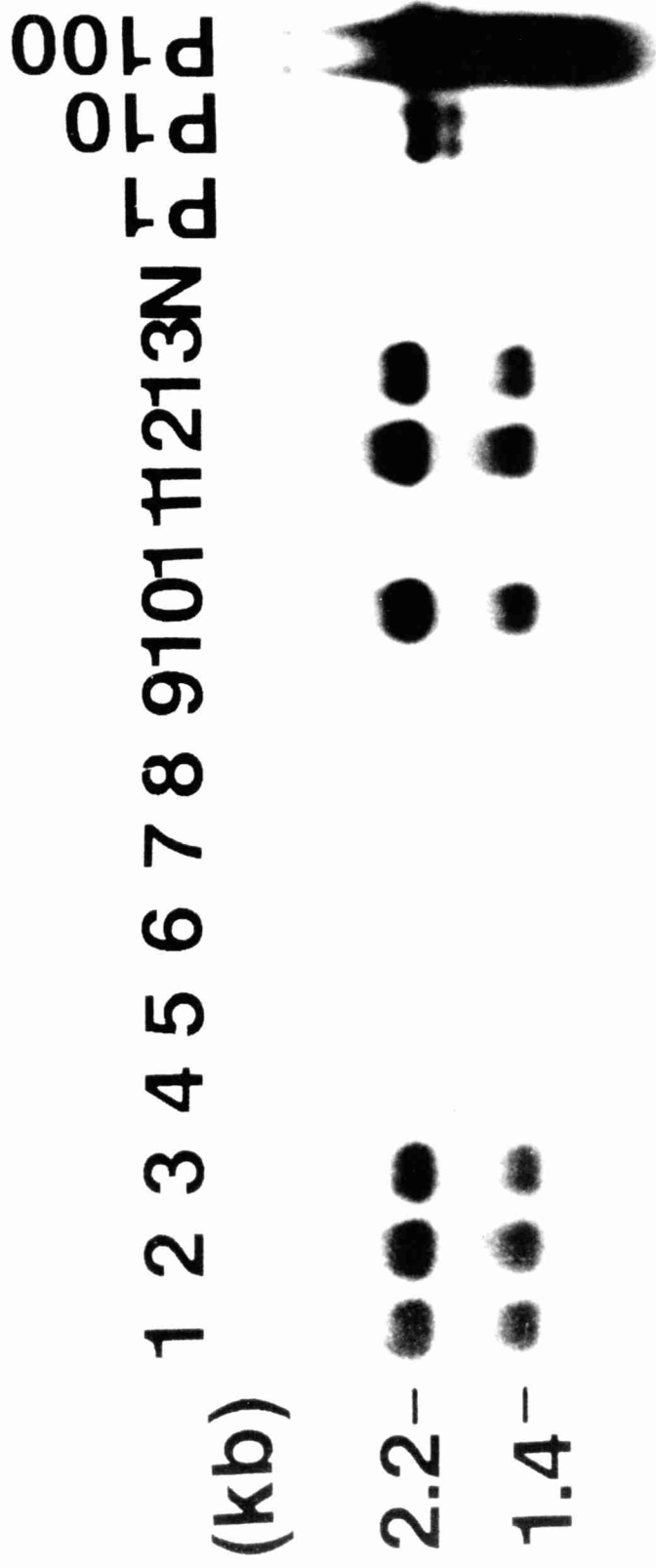


Fig.3-8

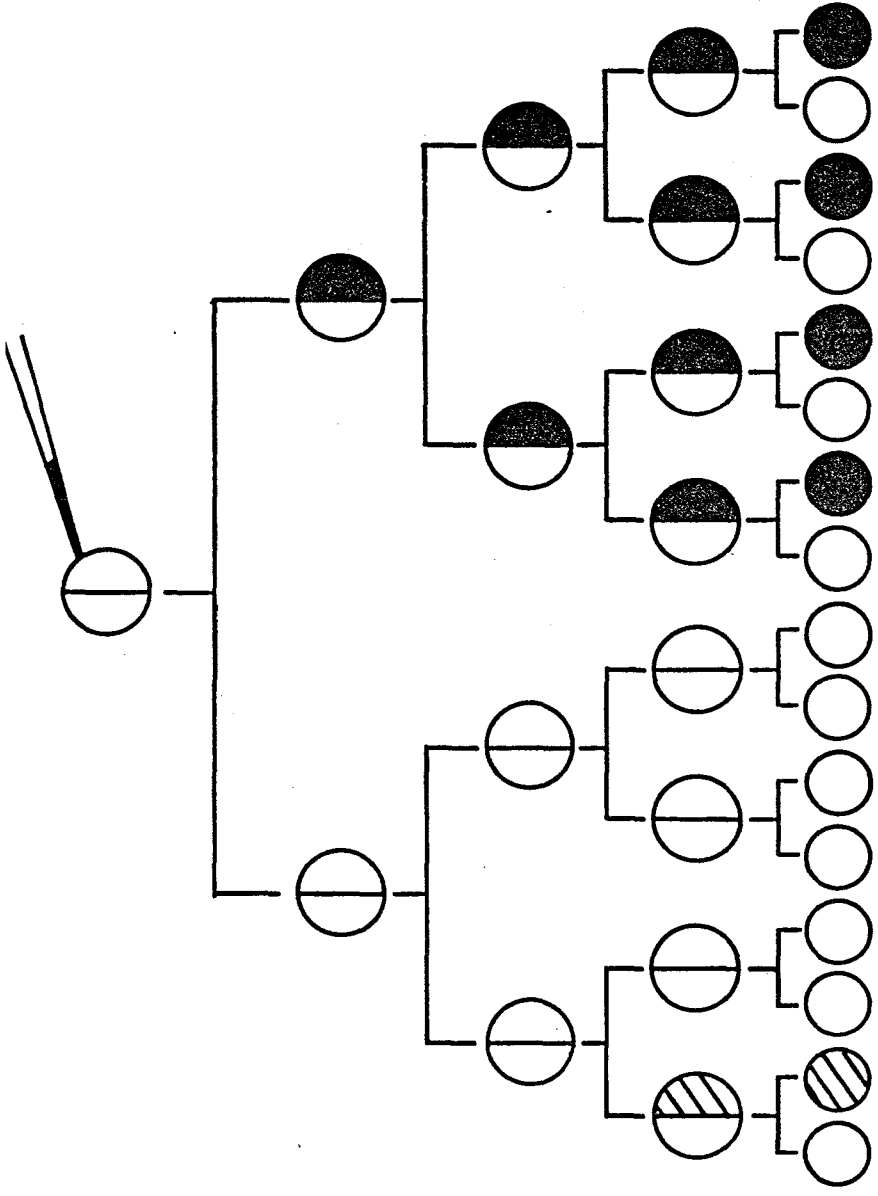


Fig. 3-9

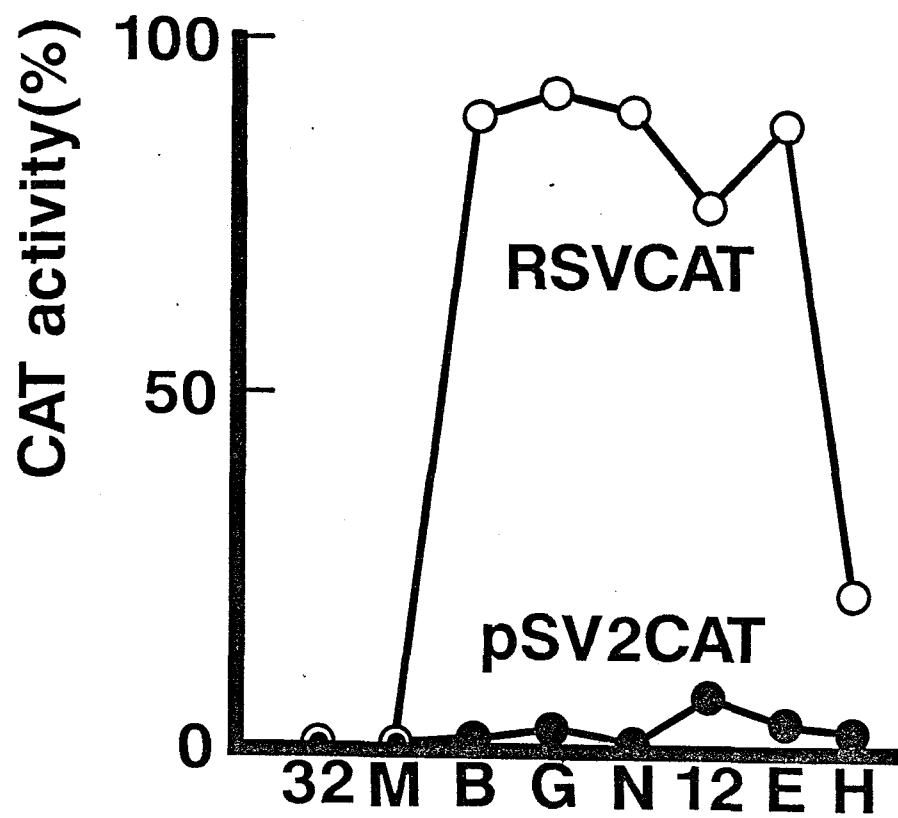


Fig.4-1

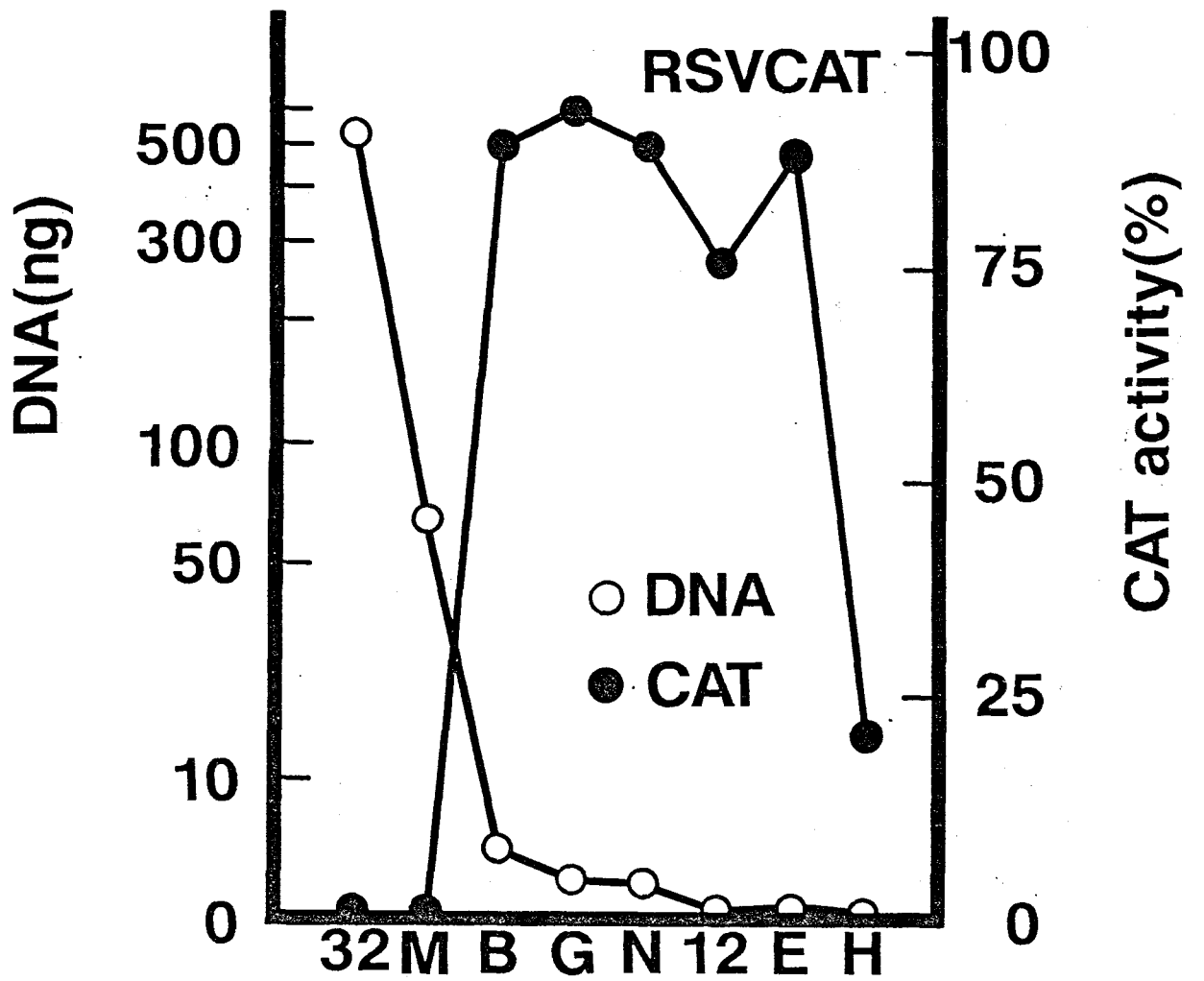


Fig.4-2

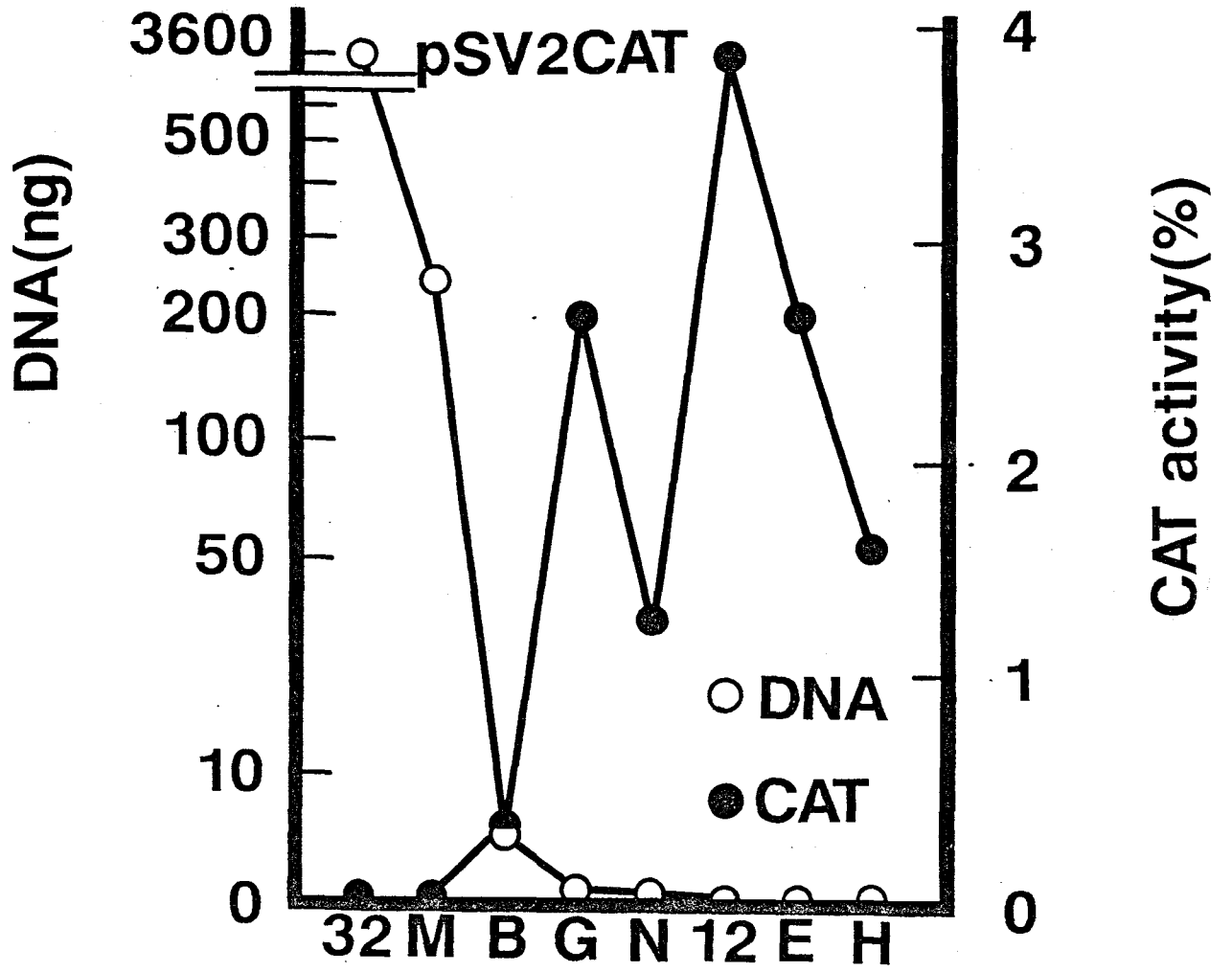


Fig.4-3

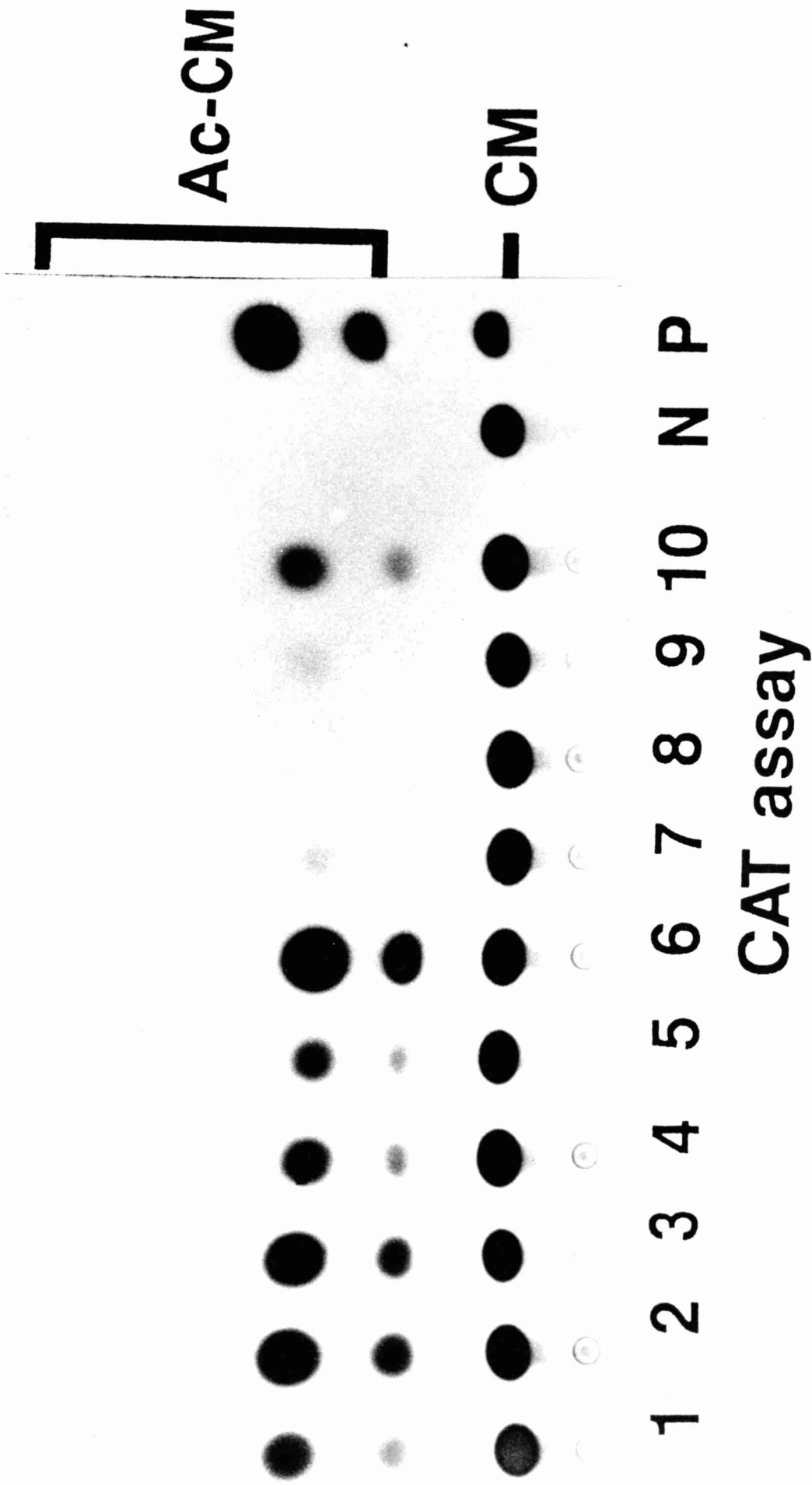


Fig.4-4

No.16

No.18

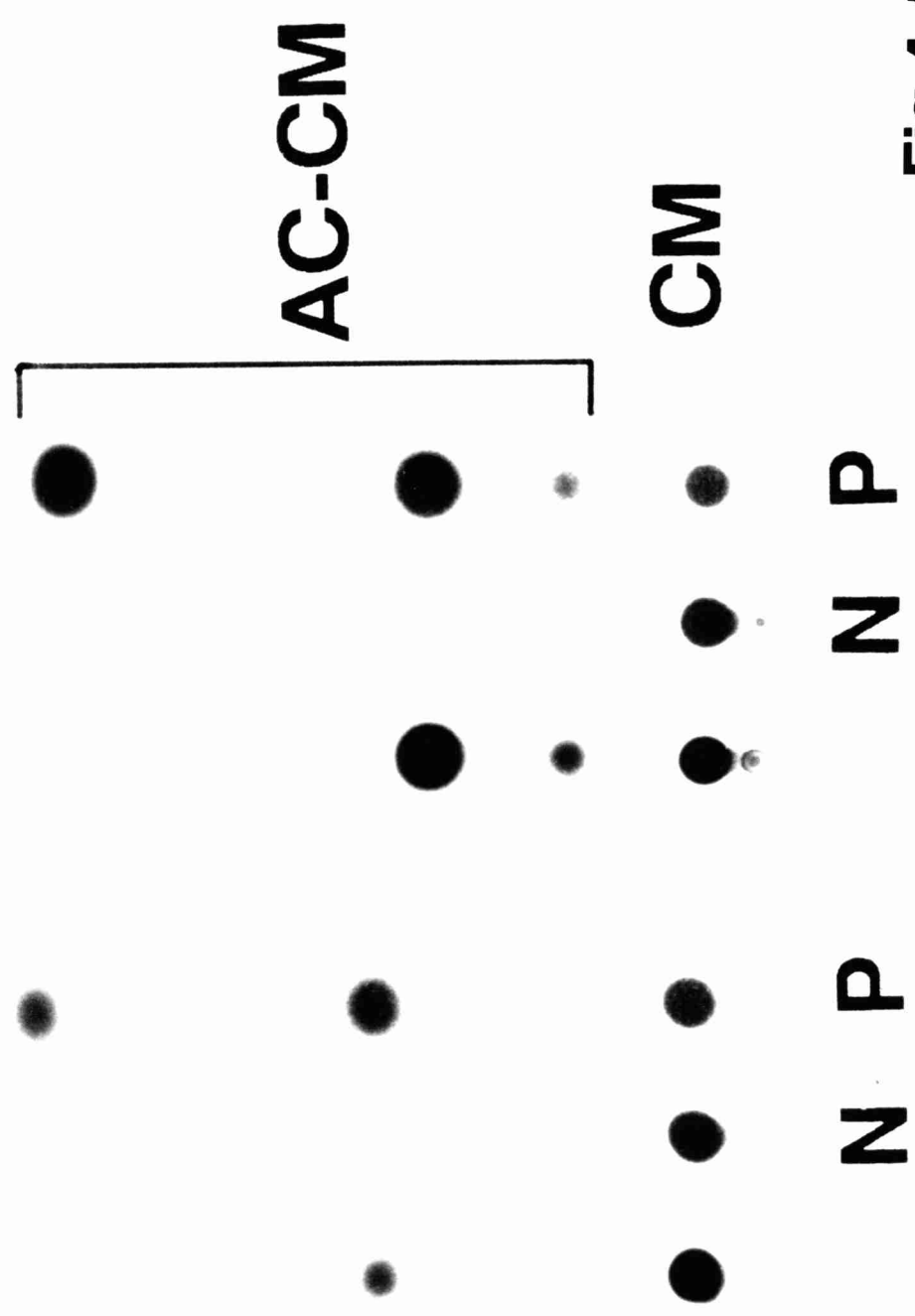


Fig.4-5

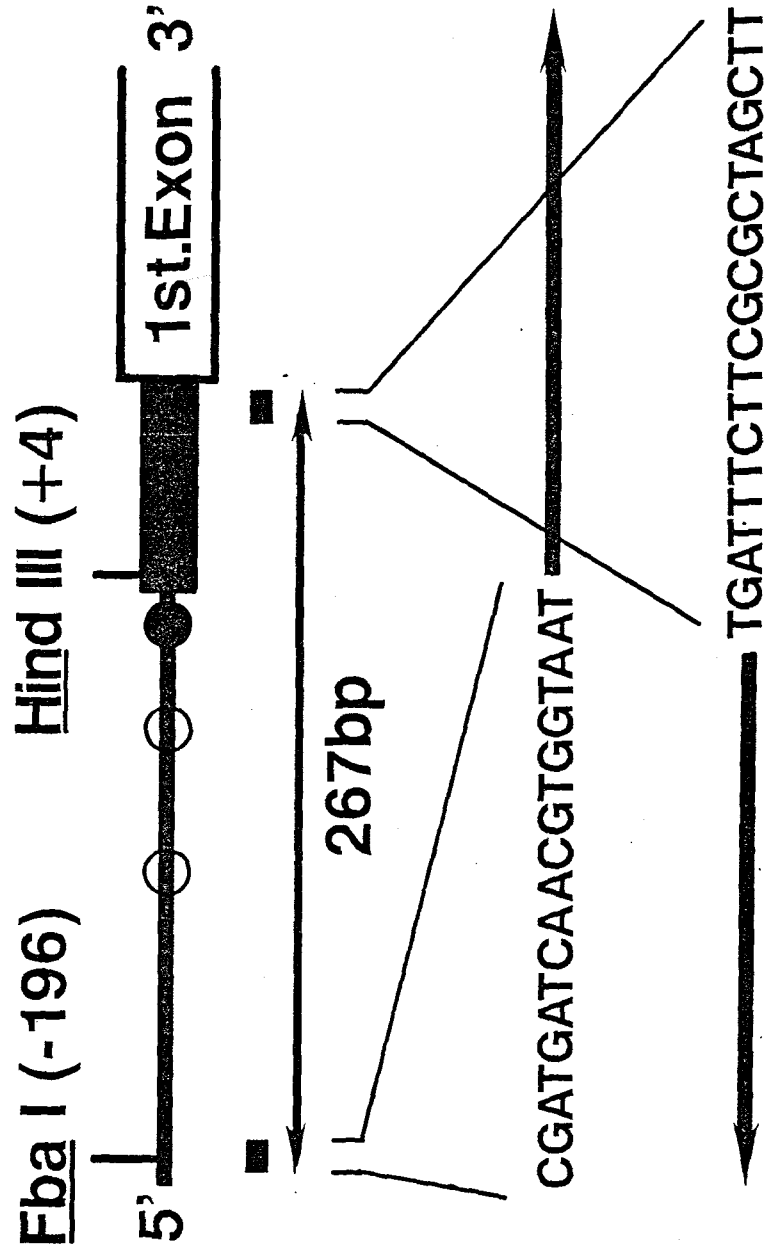


Fig. 4-6

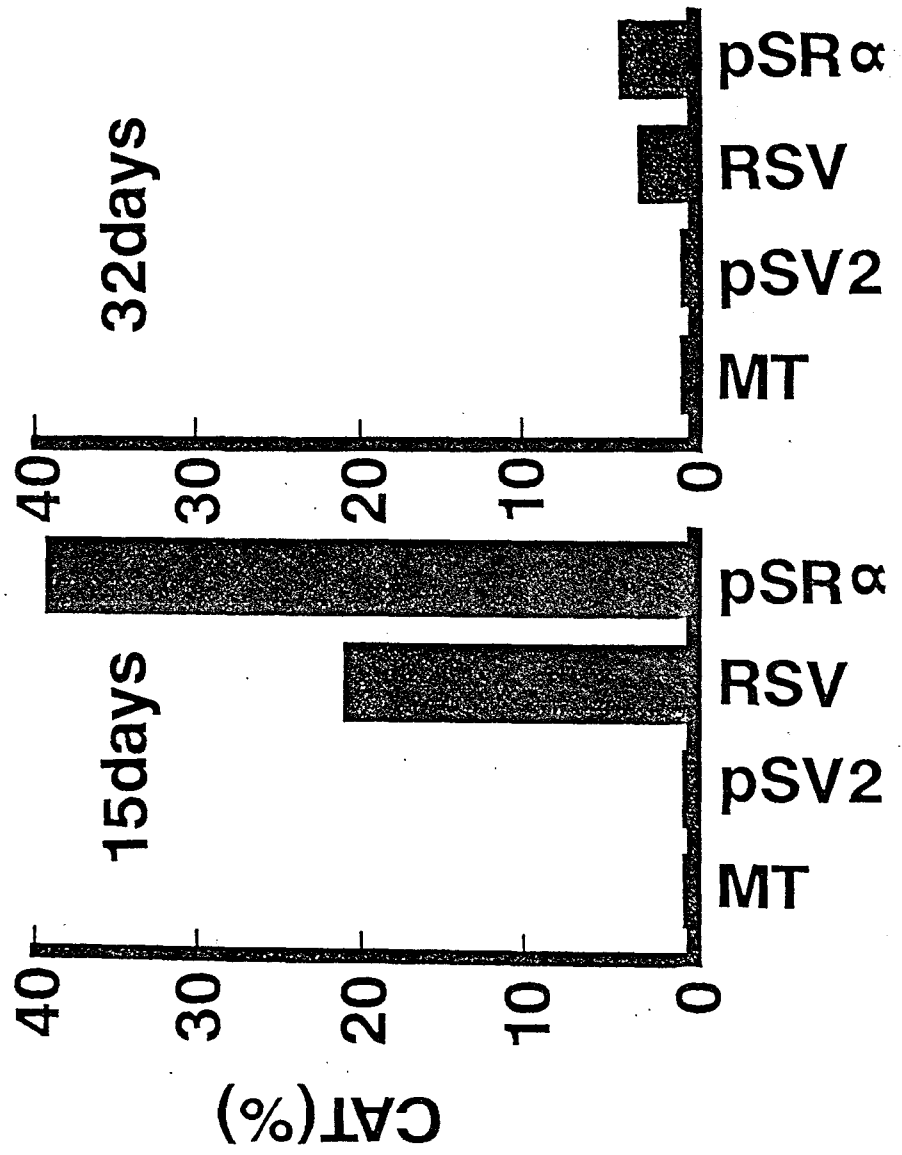


Fig.4-7

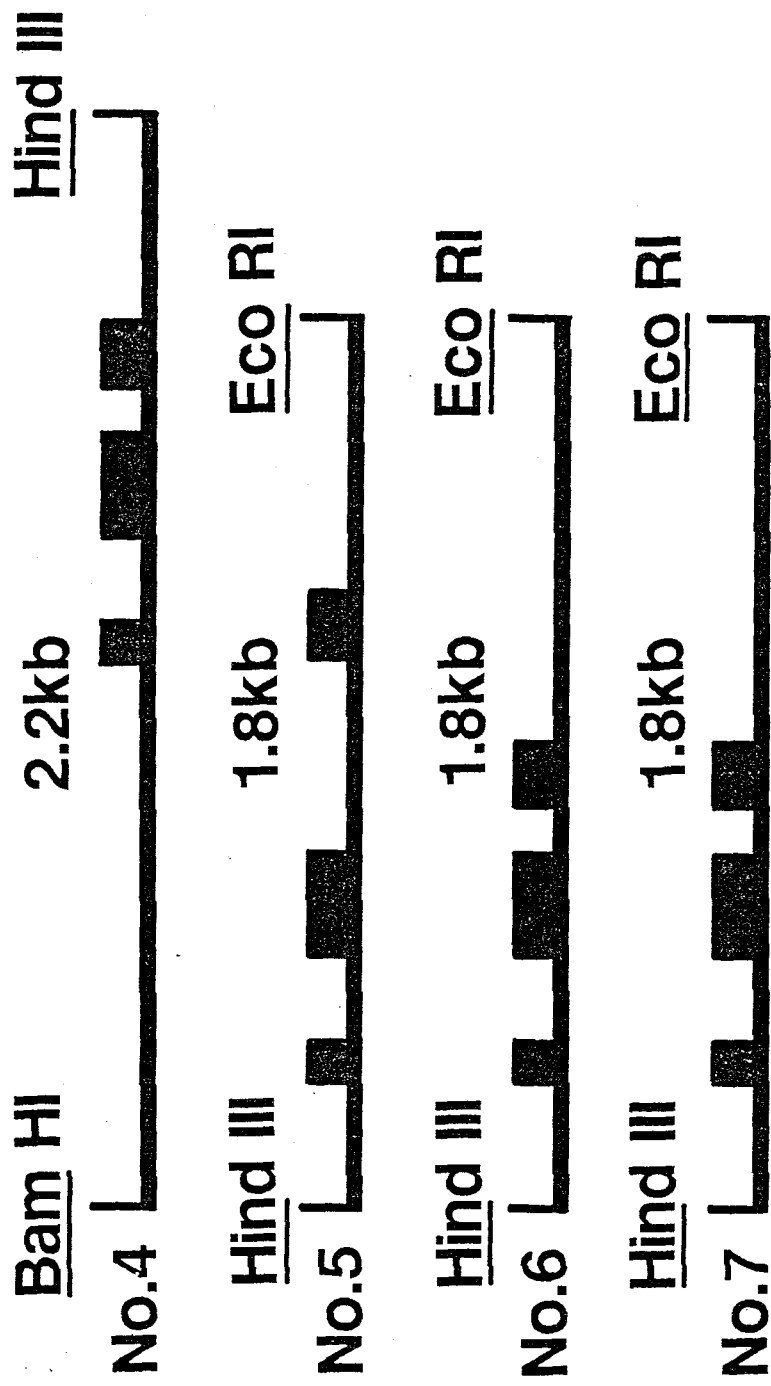
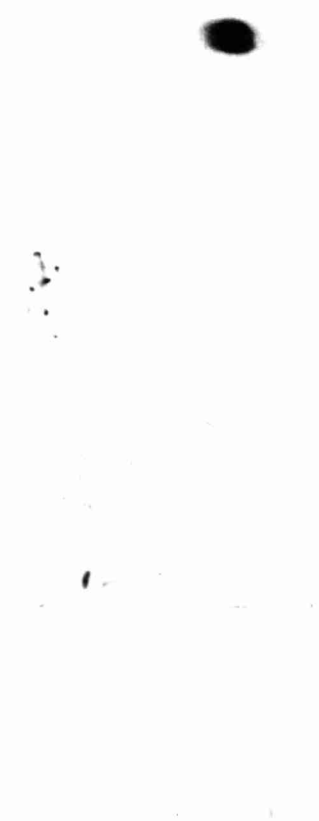


Fig.5-1

No.4 1-15 NP



No.5 1-15 NP



No.6 1-15 NP



No.7 1-15 NP

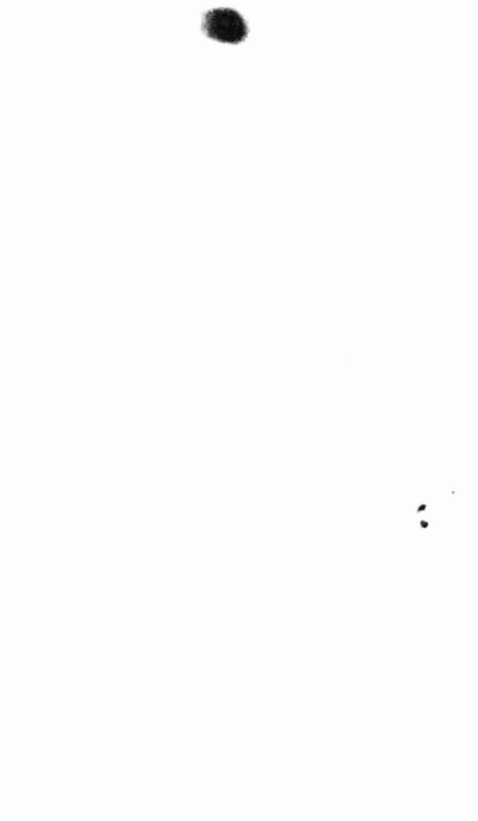


Fig.5-2

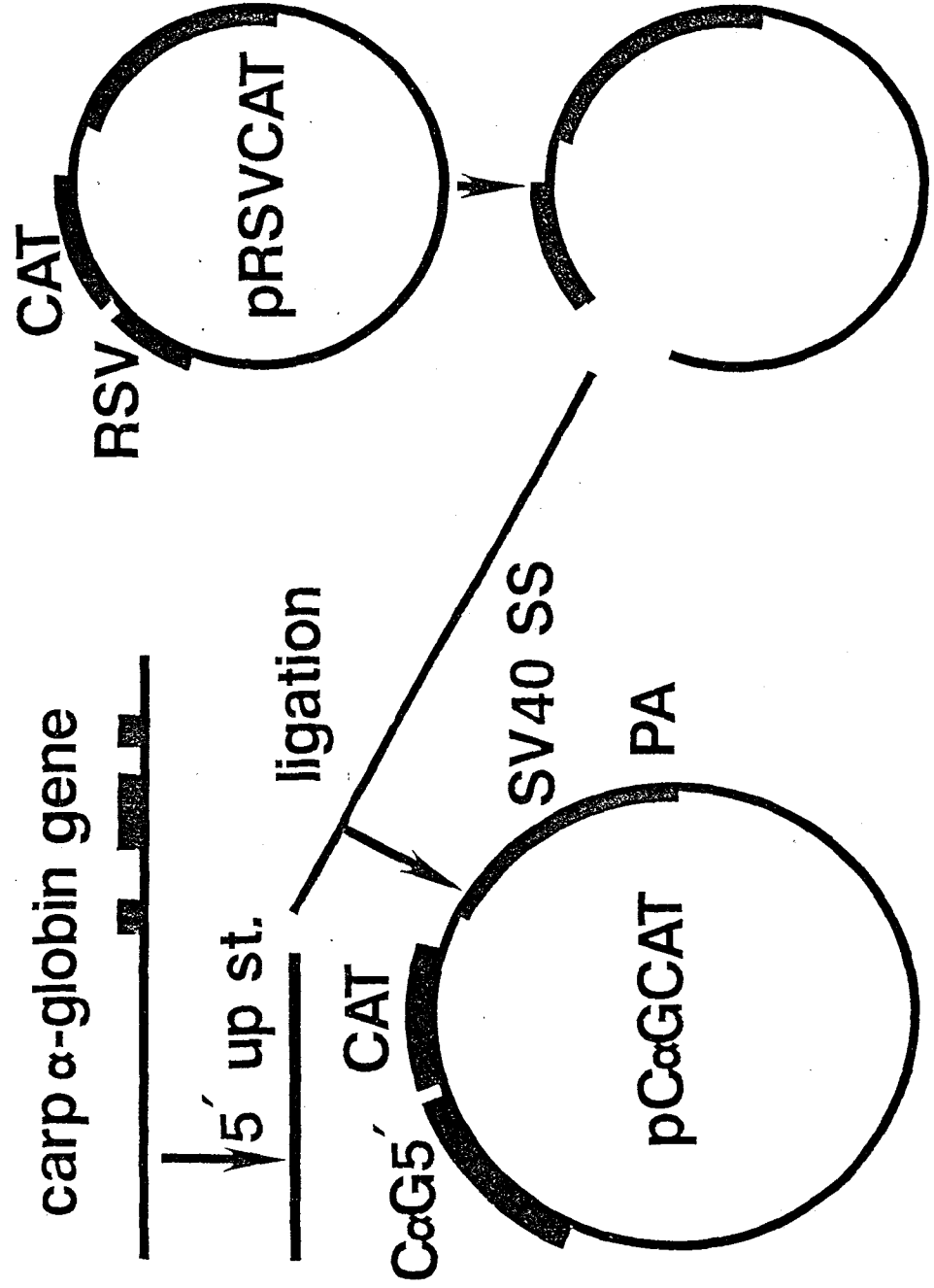


Fig. 5-3

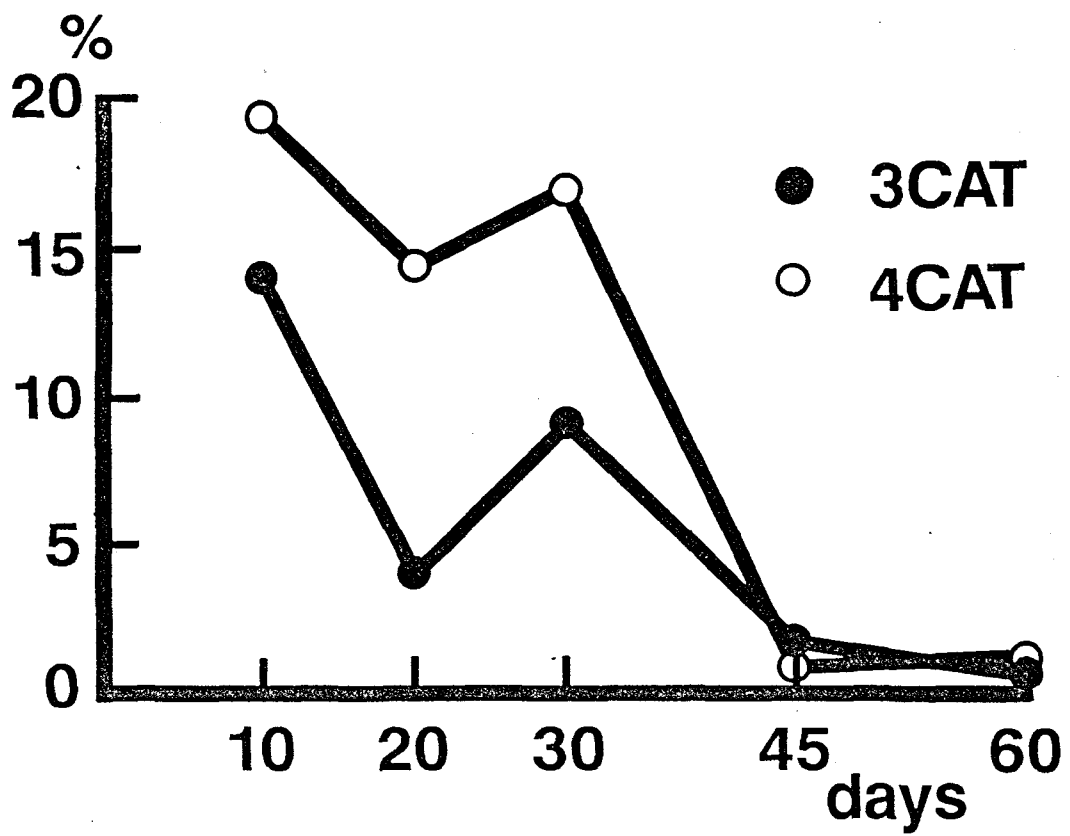


Fig.5-4

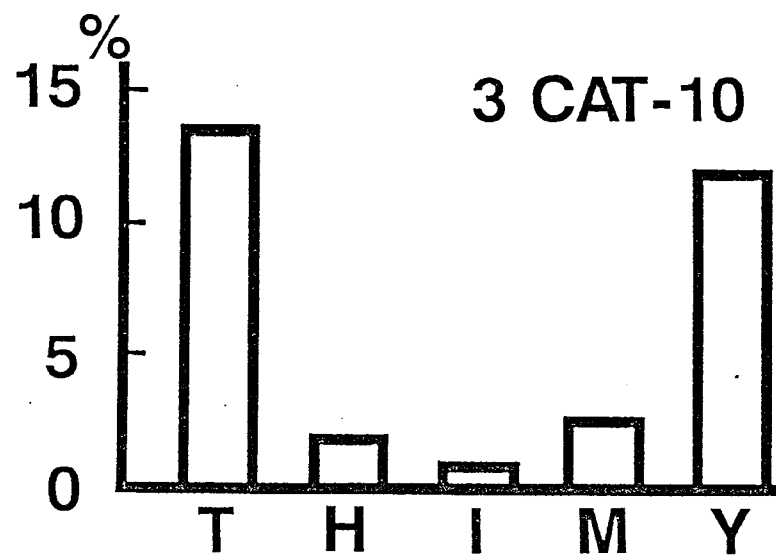


Fig.5-5

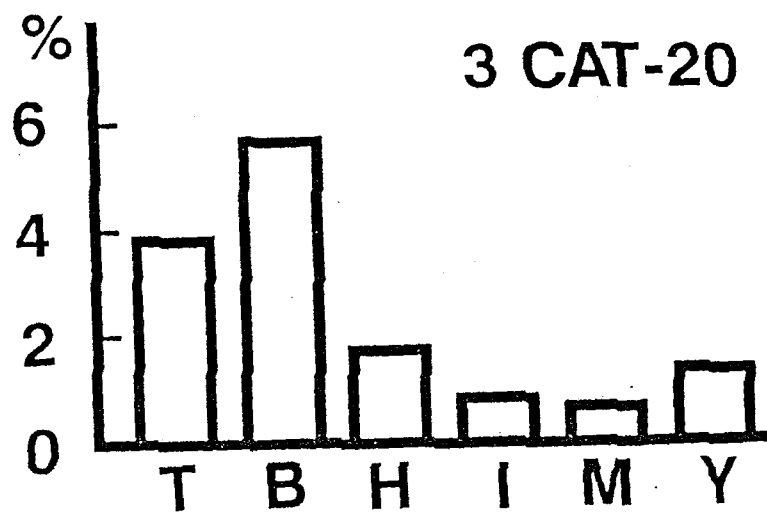


Fig.5-6

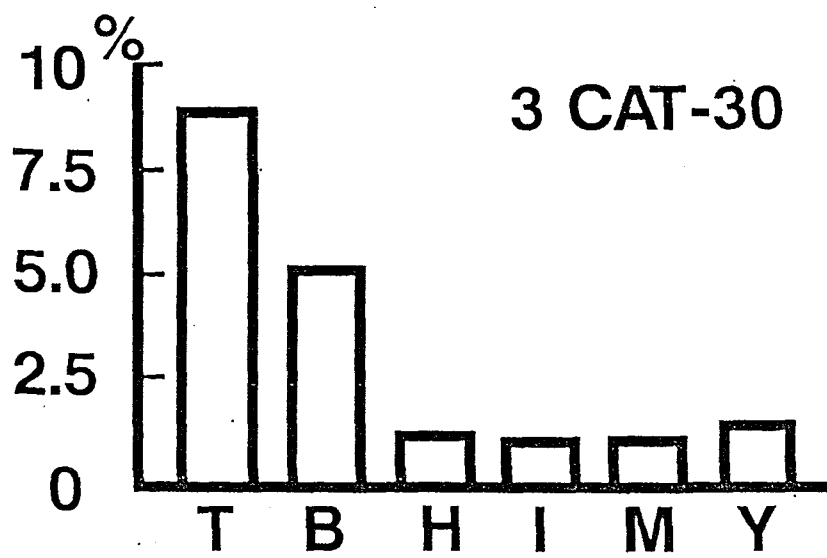


Fig.5-7

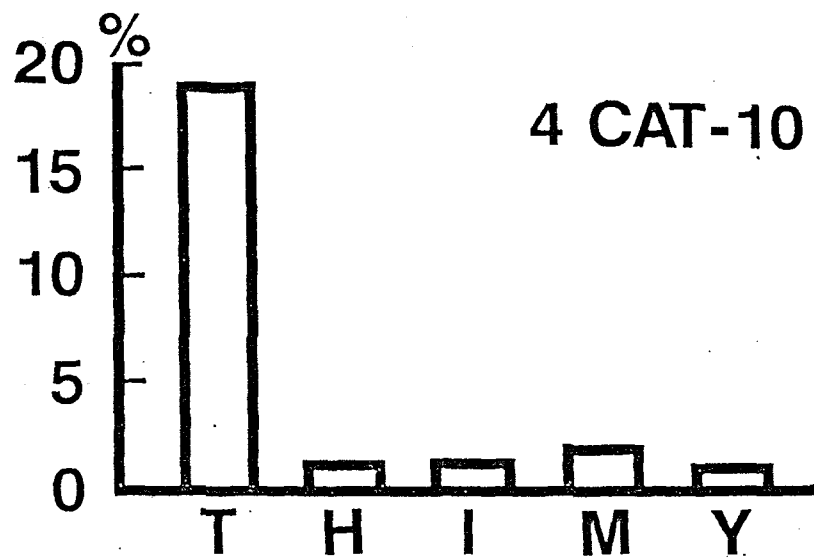


Fig.5-8

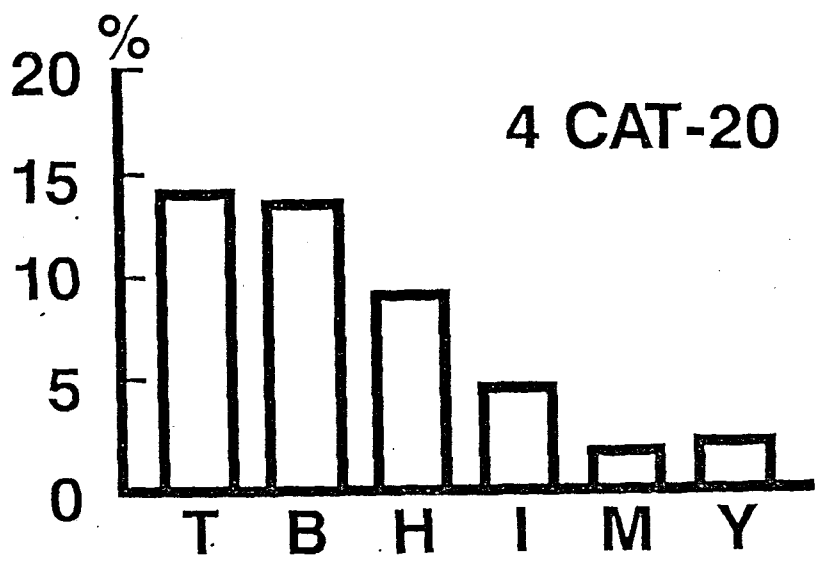


Fig.5-9

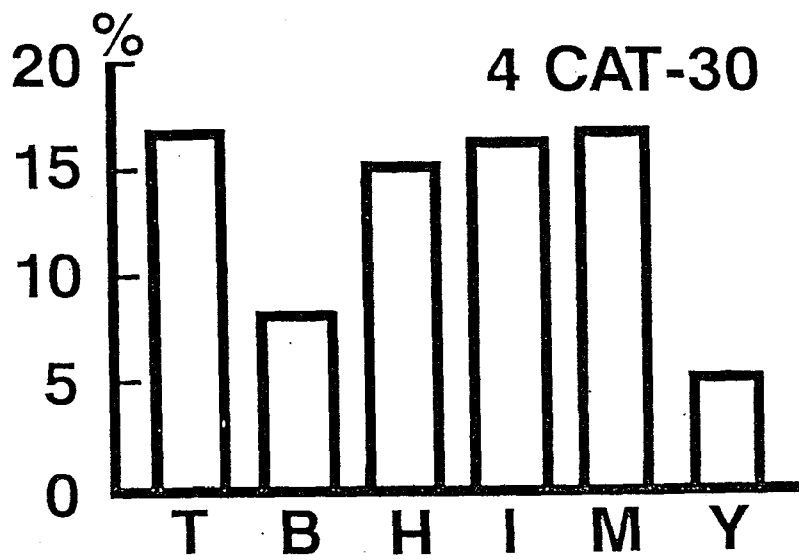


Fig.5-10

V E W T D A E R S A I I A L W G K L N P

GTTGAATGGACTGATGCTGAACG

C G C C C G

A A A

G G G

A

D E L G P E A L A R C L I V Y P W T Q R
F F A S Y G N L S S P A A I M G N P K V
A A H G R T V E G G L M R A I K D M D N
I K A T Y A P L S V M H S E K L H V D P P
D N F R L L A D C I T V C A A M K F G P P
S G F S P N V Q E A W Q K F L S V V N

GAAGCTTGGCAAAAATTTT

G C G G C

A C

G

A L K R Q Y H

2	AAACAAGTAC	CTAAGGACAC	CCTAAAACGT	AGACA <u>ATGGTT</u>	GAGTGGACAG	ATGCTGAGCG
1	-----					
3	CTT					
4	-----			C		
5	-----					
6	-----		CCT*	C		
2	AAGTGCCATC	ATTGGCCTGT	GGGGAAAGCT	CAATCCCGAT	GAACTCGGAC	CTCAGGCCCT
1						
3						
4		A			A C	
5				A		
6						
2	GGCCAGGTGT	CTGATCGTGT	ATCCCTGGAC	TCAGAGATAT	TTCGCCTCCT	TCGGAAACCT
1				G		T
3						
4				G		T
5						
6						
2	GTCAAGCCCC	GCTGCGATCA	TGGGTAACCC	CAAGGTGGCA	GCTCACGGGA	GGACTGTGAT
1						
3		T				
4		T				
5						
6						
2	GGGAGGTCTG	GAGAGAGCCA	TTAAGAACAT	GGACAACATC	AAGGCCACCT	ATGCGCCACT
1						
3			C			
4			C			
5			C			
6			C			
2	CAGTGTGATG	CACTCTGAGA	AATTGCAATG	GGATCCCGAC	AACTTCAGGC	TCCTGGCTGA
1						
3						
4						
5			C			TT
6						
2	TTGCATCACC	GTGTGCGTTG	CCATGAAGTT	TGGCCCCTCT	GGTTTCAATG	CTGACGTCCA
1					G C	A
3			C			
4			C		G	A
5	C		C		CC	A
6			C		G	A
2	GGAGGCCTGG	CAGAAGTTTC	TGTGTGTCGT	CGTTTCCGCT	CTGTGCAGAC	AGTACCACTA
1			A	G		
3						
4			A	G		
5	T			G	A	
6			A	G		
2	GATTCTCATC	ACCGATGAAC	ACCAGCTGTA	TTGCAGAAGA	TTGCGGGAGC	TGTTACACACA
1						
3						
4						
5	G	A				
6	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	AAGATCTAAC	TCTTATAAAA	TAAGATCAAT	AAAATATTGT	TAAAA	
1					G	
3						
4		T				
5			G	G	A	AAGCACTTT
6	-----	-----	-----	-----	-----	AAA poly A

Fig.5-12

1 VEWTD AERSA IIGLWGKLN P DELGPQALAR CLIVYPWTQR YFASFGNLS S

2, 3

4, 6

5

IR

1 PAAIMG NPKV AAHGRTVMGG LERA IKNMDN IKATYAPLSV MHSEKLVHVD P

2, 3

4, 6

5

1 DNFRLLADCI TVCAAMKFGP SGFSPNVQEA WQKFLSVVVS ALCRQYH

2, 3

4, 6

5

V

NAD

C

A

A NAD

C

H VHLTPEEKSA VTALWGKVNV DEVGGEALGR ELVVY^oPW^oTQR ~~EESEFGDLST~~
 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
 1 VEWD^oDAERSA IIGLWGKLN^oP DELGPQALAR CLIVYPWTQR YFASFGNLSS
 2, 3
 4, 6
 5 IR

H PDAVMGNPKV ~~KAHGK^oVLGA~~ ESDGLAHLDN LKGT^oFATISE ~~LHC^oDKLHVDP~~
 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
 1 PAAIMGNPKV AAHGRTVMGG LERA^oIKNMDN IKATYAPLSV MHSEKLVDP
 2, 3
 4, 6
 5

H ENFRLLGNVL VC^oVLAHHFG- KE^oT^oPPVQAA YQKV^oVAGVAN AHAH^oKYH
 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
 1 DNFRLLADCI TVCAAMKFGP SGFSPNVQEA WQKFLSVVVS ALCRQYH
 2, 3 V NAD C
 4, 6 A
 5 A NAD C

Fig.5-14

表1-1. 還元型グルタチオン処理後のニジマス卵の卵膜硬化度と初期生残率(%)

グルタチオン濃度	pH	硬化抑制	受精率	孵化率
0.5 (mM)	8	○	81.7	72.5
	10	○	79.2	72.5
1.0	8	○	82.5	75.8
	10	○	85.0	68.3
2.0	8	○	95.0	90.0
	10	○	96.7	85.0
C		×	85.8	72.5

表2-2. パルス幅がコイの運動精子の割合 (%)
に与える影響

		親魚 No.			
パルス幅 (μ 秒)	1	2	3	4	
0	90	90	100	100	
200	50	50	70	90	
300	50	40	50	80	
400	50	10	50	80	
500	40	10	5	60	

表3-1. CaG導入ニジマス精子で媒精した卵の
受精率および初期生残率 (%)

親魚	供試卵数	受精率	発眼率	孵化率	浮上率
2F6C	224	96.7	84.7	68.3	51.3
260D	228	100	91.7	82.0	71.9
3151	236	100	90.3	71.2	55.9
4141	261	100	88.9	80.1	64.0
対照区	190	96.7	93.7	81.6	67.9

表3-2. CaG導入ニジマスF₂の受精率および初期生残率(%)

	受精率	発眼率	孵化率	浮上率
F ₂	80	86.6	85.3	81.0
C	80	86.1	86.1	81.7

表5-1. コイ β -グロビンcDNA
相互間のホモロジー (%)

	2	3	4	5	6
1	98.2	98.6	99.3	96.0	98.7
2		99.6	97.8	97.1	98.2
3			98.2	97.2	98.2
4				96.0	98.9
5					96.6

表5-2. コイβ-グロビンアミノ酸配列
相互間のホモロジー

	2, 3	4, 6	5
1	96.6	99.3	95.2
2, 3		97.3	97.3
4, 6			95.9

表5-3. コイの各 β -グロビンアミノ酸配列の他生物とのホモロジー

	1	2,3	4,6	5
コイ*	93.9	90.5	93.2	89.1
キンギョ	97.3	98.0	98.0	96.6
ニジマス 1	65.8	65.1	65.1	65.1
ニジマス 4	76.9	78.2	77.6	77.6
ハイギョ	44.9	44.2	44.2	43.5
<u>Xenopus</u>	44.2	43.5	43.5	43.5
ニワトリ	57.8	57.1	57.1	56.5
ヒト	52.4	51.7	51.7	51.0

* Grujic-Injacら(1980)による。