

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-245299

(P2000-245299A)

(43) 公開日 平成12年9月12日 (2000.9.12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
A 0 1 K 67/033	5 0 1	A 0 1 K 67/033	5 0 1 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平11-48443

(22) 出願日 平成11年2月25日 (1999.2.25)

(71) 出願人 599026544

財団法人日本真珠研究所

京都府京都市左京区北白川追分町81-2

(72) 発明者 三木 敬三郎

神奈川県中郡大磯町東小磯548-7

(72) 発明者 三輪 錠司

神奈川県横浜市磯子区杉田坪谷6-30

(72) 発明者 磯和 望

三重県志摩郡志摩町越賀822-4

(74) 代理人 100088546

弁理士 谷川 英次郎

Fターム(参考) 4B024 AA10 BA23 BA24 BA80 CA04

DA02 EA04 GA12

(54) 【発明の名称】 ウイルス抵抗性トランスジェニック軟体動物及びその作出方法

(57) 【要約】

【課題】 ウイルス抵抗性を有するトランスジェニック軟体動物及びその作出方法を提供すること。

【解決手段】 ウイルス抵抗性を付与する外来遺伝子が導入され、該外来遺伝子を発現するトランスジェニック軟体動物を提供した。また、本発明は、導入しようとする、ウイルス抵抗性を付与する外来遺伝子又は該外来遺伝子を含む核酸をベクターに組み込んだ組換えベクターを軟体動物のオス及び/又はメスの生殖巣にマイクロインジェクションし、これらのオスとメスを交配させて第1代を作り、前記ウイルス抵抗性を付与する外来遺伝子を発現している個体を選択することを含む、上記本発明のトランスジェニック軟体動物の作出方法を提供した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ウイルス抵抗性を付与する外来遺伝子が導入され、該外来遺伝子を発現するトランスジェニック軟体動物。

【請求項2】 貝類である請求項1記載のトランスジェニック軟体動物。

【請求項3】 真珠貝である請求項2記載のトランスジェニック軟体動物。

【請求項4】 前記ウイルス抵抗性を付与する遺伝子はインターフェロン 遺伝子又はインターフェロン 遺伝子である請求項1ないし3のいずれか1項に記載のトランスジェニック軟体動物。

【請求項5】 導入しようとするウイルス抵抗性を付与する外来遺伝子又は該外来遺伝子を含む核酸をベクターに組み込んだ組換えベクターを軟体動物のオス及び/又はメスの生殖巣にマイクロインジェクションし、これらのオスとメスを交配させて第1代を作り、前記所望の遺伝子を発現している個体を選択することを含み、請求項1ないし4のいずれか1項に記載のトランスジェニック軟体動物の作出方法。

【請求項6】 前記所望の遺伝子を発現している前記第1代のオスとメスを交配して第2代を作り、前記所望の遺伝子を発現している個体を選択することをさらに含む、請求項5記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ウイルス抵抗性を付与したトランスジェニック軟体動物及びその作出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】真珠養殖に用いられる稚貝及び母貝は、従来から外部のウイルスの感染に抵抗性が低いあるいは無いことが知られている。このため、養殖場にウイルス感染が生じたと見られる場合は、養殖籠を感染していない他の海域に移動するなどの消極的な方法が主たる感染防御手段として採られてきた。すなわち、細菌やウイルス等から真珠稚貝及び母貝を病害感染から積極的に防御する方法は、海水への薬品の直接散布以外存在しない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】もし、ウイルス抵抗性を有するトランスジェニック真珠貝が得られれば、養殖真珠産業にとって有利である。しかしながら、このような有用な性質を有するトランスジェニック真珠貝は言うに及ばず、軟体動物門全体においても、所望の外来遺伝子を発現することができるトランスジェニック軟体動物は現在までのところ作出されていない。

【0004】従って、本発明の目的は、ウイルス抵抗性を有するトランスジェニック軟体動物及びその作出方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、鋭意研究の結果、ウイルス抵抗性を付与する外来遺伝子を軟体動物のオス及び/又はメスの生殖巣にマイクロインジェクションし、それらのオスとメスを交配することにより、ウイルス抵抗性を付与する外来遺伝子を発現するトランスジェニック軟体動物を作出することに成功し、本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明は、ウイルス抵抗性を付与する外来遺伝子が導入され、該外来遺伝子を発現するトランスジェニック軟体動物を提供する。また、本発明は、導入しようとする、ウイルス抵抗性を付与する外来遺伝子又は該外来遺伝子を含む核酸をベクターに組み込んだ組換えベクターを軟体動物のオス及び/又はメスの生殖巣にマイクロインジェクションし、これらのオスとメスを交配させて第1代を作り、前記ウイルス抵抗性を付与する外来遺伝子を発現している個体を選択することを含み、上記本発明のトランスジェニック軟体動物の作出方法を提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明のトランスジェニック軟体動物は、軟体動物門に属する動物であればいずれのものでもよいが、好ましい例として、ニマイガイ綱(斧足類)やマキガイ綱(腹足類)のような貝類、とりわけ、アコヤガイ、シロチョウガイ、クロチョウガイのような真珠貝を挙げることができる。

【0008】軟体動物に導入されるウイルス抵抗性を付与する外来遺伝子は、軟体動物にウイルス抵抗性を与えることができるいずれの遺伝子であってもよい。好ましい例として、インターフェロン 遺伝子及びインターフェロン 遺伝子を挙げることができる。

【0009】本発明のトランスジェニック軟体動物は次のようにして作出することができる。すなわち、上記ウイルス抵抗性を付与する外来遺伝子又は該外来遺伝子を含む核酸をベクターに組み込んだ組換えベクターを、軟体動物のオス及びメスの生殖巣にマイクロインジェクションにより注入し、これらのオスとメスを交配して第1代の個体を作り、該第1代の個体の中から上記所望の外来遺伝子を発現している個体を選択する。

【0010】マイクロインジェクションされる組換えベクターに組み込むべきものは、上記ウイルス抵抗性を付与する外来遺伝子のみであってもよいし、該外来遺伝子を含む核酸であってもよい。このような核酸の例として、該外来遺伝子の上流に、軟体動物細胞中でプロモーター活性を発揮するプロモーターを結合したものと該外来遺伝子を他の遺伝子と融合させた融合遺伝子等を挙げることができる。ベクターとしては、アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターのような動物細胞用ベクターを挙げることができる。これらのベクターは市販されているので、市販品を用いることができる。

【0011】上記組換えベクターを軟体動物の生殖巣に

マイクロインジェクションする方法について説明する。基本的には、組換えベクターを含む溶液を注射針で直接生殖巣内に注入することにより行なうことができる。マイクロインジェクション用の溶液の媒体としては、TE緩衝液のような緩衝液でよく、溶液中の組換えベクターの濃度は、2~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度が好ましく、特に5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度が好ましい。注入する溶液の量は、1箇所につき10~50 μl 程度が好ましく、卵巣、精巣とも2~4箇所程度に注入することが好ましい。

【0012】マイクロインジェクション後、10~25、好ましくは15~20で24~72時間、好ましくは24~48時間放置した後、マイクロインジェクションしたオスとメスを交配させる。交配は自然交配でもよいが、再現性良く確実に交配させるために人工授精を行なうことが好ましい。人工授精は、基本的に、マイクロインジェクションした精巣からの精子をマイクロインジェクションしたメスの卵巣中の成熟卵に添加することにより行なうことができる。なお、マイクロインジェクションは、交配させるオス及びメスの両者の生殖巣に対して行うことが好ましいが、いずれか一方の生殖巣に対して行ってもトランスジェニック軟体動物を作出することが可能である。軟体動物の人工授精の方法自体はDev Biol 1994, 163(1): 162-174に記載の方法により行なうことができる。

【0013】受精卵からの個体の育成は、受精卵を海水又は人工海水中で、その軟体動物の通常の生育温度範囲でインキュベートすることにより容易に行なうことができる。

【0014】次いで、得られた個体から形質転換体を選択する。これは、軟体動物の細胞中に、導入しようとするウイルス付与抵抗性外来遺伝子が存在するか否かをサザンブロット法により調べ、さらに軟体動物細胞で該外来遺伝子が発現されているか否かをノーザンブロット法により調べることにより行なうことができる。サザンブロット法及びノーザンブロット法自体及びそのための試料の調製方法自体はこの分野において周知であり、例えば中山・西方著、「バイオ実験イラストレイテッド - ② 遺伝子解析の基礎」、秀潤社(1995)に記載されている。

【0015】形質転換ラインを確立するために、上記の方法により形質転換体であることが確認された第一代の軟体動物のオス及びメスを上記と同様にして交配させ、第二代の個体を得、その中から上記と同様にして形質転換体を選択することが好ましい。さらに第三代以降を同様にして作ることにより、より確実に形質転換ラインを確立することが可能である。

【0016】

【実施例】以下、本発明を、実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定され

るものではない。

【0017】**実施例1** ヒトインターフェロン 遺伝子を導入したトランスジェニックアコヤガイの作出
ヒトあるいはマウスインターフェロン 遺伝子(BBL社、RDS社より市販)をアデノウイルスベクター(宝酒造社製、タカラ・アデノウイルス発現ベクターキット)に組み込み組換えベクターを作製した。この操作は具体的には次のようにして行なった。上記市販のインターフェロン 遺伝子をコスミドベクター(pAxcwt(44,741 bp), Niwa, M. et al., (1991) Gene 108, 193,上記市販のアデノウイルス発現ベクターキットに含まれている)のSwa I部位に挿入した。組み込まれた遺伝子を持つコスミドベクターと、上記制限酵素で処理した上記市販のアデノウイルス由来DNA-TPC (Miyake, S. et al., (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 1320)とを293細胞(ヒト胎児腎細胞、大日本製薬株式会社製)に共存導入した。共存導入は、具体的には次のように行なった。293細胞を10% FCS添加DMEM培地で、5% CO₂、37 °Cの条件下に100%コンフルエントに培養し、上記コスミドベクターDNA 10 μg と制限酵素処理済みDNA-TPC 5 μg とを直径6 cmのシャーレ上で混合した。このトランスフェクションはリン酸カルシウム法で行なった。共存導入後の細胞を37 °C、5% CO₂で24時間培養後、増殖した組換えアデノウイルスの分画を集め、DNA量(100~200 mg/個)をアコヤガイの卵巣に注入し、別にオスから取出した精子(卵子の2倍量)と試験管内で混合し受精させた。これを海水中25 °Cで、24日間培養し、稚貝を得た。200個の稚貝31個中に、インターフェロン用DNAプローブの蛍光(FITC)の発色が見られた。さらに稚貝のDNAを精製し、同じDNAプローブにより配列を確認した。これらの貝は継続養殖された。

【0018】また、ウイルス感染により閉殻筋が赤色に変化することが報告されており、インターフェロン遺伝子の存在が確認された成員では、20個中18個でこの赤変が見られなかった。

【0019】一方、上記のようにして得た組換えアデノウイルスベクターをHela細胞にトランスフェクトし、Hela細胞中で増殖させた。Hela細胞へのトランスフェクト及び増殖は、Nature 1995, 374(6523):660-662に記載された方法により行なった。Hela細胞から常法により組換えベクターDNAを回収し、これを10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTAないし20 mMリン酸カリウム、3 mMクエン酸カリウム、2% PEG-6000 (pH7.5)中にDNA量50~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で溶解してマイクロインジェクション用溶液を調製した。該溶液を、アコヤガイのメスの卵巣及びオスの精巣にマイクロインジェクションした。注入した溶液の量は、1箇所当たりDNA換算100 μg で、卵巣又は精巣にそれぞれ3箇所注入した。24~48時間後、精巣からの精子と卵巣からの成熟卵を

用いて人工授精を行なった。人工授精は具体的には次のようにして行なった。アコヤ貝のオスより精巣を、メスより卵巣をそれぞれ切除し、試験管に精子と卵子を取出し1:2の割合で混合した。受精卵を海水中で2~3週間、25℃でインキュベートすることにより受精卵から第一代のアコヤガイ個体を得た。得られたアコヤガイの生殖巣から常法により全DNAを回収し、ヒトインターフェロン 遺伝子をプローブとして用いて常法(「バイオ実験イラストレイテッド」、上掲)によりサザンブロット法を行なった。さらに、アコヤガイの内臓塊、閉殻筋細胞から常法により全mRNAを回収し、ヒトインターフェロン 遺伝子をプローブとして用いて常法(「バイオ実験イラストレイテッド」、上掲)によりノーザンブロット法を行なった。

【0020】サザンブロット陽性かつノーザンブロット陽性のメス及びオスの個体から採取した成熟卵及び精子を用いて上記と同様に人工授精を行い、上記と同様にして第2代の個体を得た。上記と同様にサザンブロット及びノーザンブロットを行なうことにより、ヒトインターフェロン 遺伝子を導入したトランスジェニックアコヤガイを3ライン選択した。

【0021】養殖アコヤガイの状態から、ウイルス汚染されていると考えられる海域及びウイルス汚染されていないと考えられる海域において、上記のように作出したトランスジェニックアコヤガイ及び対照として従来のアコヤガイを180日間養殖し、その致死率を比較した。結果を下記表1に示す。

【0022】

【表1】表1 ヒトインターフェロン 遺伝子導入の効果(360日間養殖)

アコヤガイ	致死率(%)	
	非汚染海水	汚染海水
従来種	10	95
ライン1	6	30
ライン2	1	35
ライン3	7	32

【0023】表1から明らかのように、本発明のトラン

10

20

30

スジェニックアコヤガイ(ライン1~3)では、非汚染海域における致死率は従来種と同等であるにもかかわらず、汚染海域における致死率は従来種よりも遥かに低かった。このことから、ヒトインターフェロン 遺伝子導入による致死率低下の効果が明瞭に認められた。

【0024】実施例2 ヒトインターフェロン 遺伝子を導入したトランスジェニックアコヤガイの作出
ヒトインターフェロン 遺伝子に代えて、ヒトインターフェロン 遺伝子(BBL社より市販、HIGASHI, Y. et al. (1983) J. Biol. Chem. 258:92)を用いること、及びサザンブロット及びノーザンブロットで用いたプローブがインターフェロン 遺伝子の5'末端40塩基ないし50塩基の配列フラグメントをFITC蛍光で修飾したプローブを用いたことを除き、実施例1と同じ操作を行い、ヒトインターフェロン 遺伝子が導入されたトランスジェニックアコヤガイ(第2代)を作出した。

【0025】ヒトインターフェロン 遺伝子導入の効果を実施例1と同様にして調べた。結果を下記表2に示す。

【0026】

【表2】表2 ヒトインターフェロン 遺伝子導入の効果(180日間養殖)

アコヤガイ	致死率(%)	
	非汚染海域	汚染海域
従来種	11	94
ライン1	10	28
ライン2	14	22
ライン3	12	15

【0027】実施例1の場合と同様、ヒトインターフェロン 遺伝子導入の効果が明瞭に認められた。

【0028】

【発明の効果】本発明により、ウイルス抵抗性を付与する外来遺伝子を発現することができるトランスジェニック軟体動物が初めて提供された。本発明により、ウイルス抵抗性を有する真珠貝等の産業上有用なウイルス抵抗性軟体動物を作出することが可能になった。