

F-7 遺伝子組換え生物の開放系利用による遺伝子移行と生物多様性への影響評価に関する研究

(1) 遺伝子組換え微生物の微生物多様性への影響評価手法の開発に関する研究

④ 微生物多様性に及ぼす組換え魚の影響に関する研究

独立行政法人 国立環境研究所

化学物質環境リスク研究センター 健康リスク評価研究室

青木康展

<研究協力者>

独立行政法人 国立環境研究所

化学物質環境リスク研究センター 健康リスク評価研究室 天沼喜美子、橋本顯子

平成 15～17 年度合計予算額 17,207 千円

(うち、平成 17 年度予算額 5,342 千円)

※上記の予算額には、間接経費 3,971 千円を含む

[要旨]

本サブテーマの目標は、魚のゲノム DNA に導入された外来性遺伝子が、微生物に移行する可能性を明らかにすることである。我々は *rpsL* トランスジェニックゼブラフィッシュを作出しているが、この遺伝子導入魚のゲノム DNA には、大腸菌のカナマイシン耐性を決定する遺伝子 KanR が載ったプラスミド (pML4) が組み込まれている。この *rpsL* トランスジェニックゼブラフィッシュを活用して pML4 をモデル・プラスミドとして、外来性遺伝子の微生物への移行の可能性を検討した。

この可能性を検証する前提条件として、純化した pML4 が代表的な腸内細菌である大腸菌 (*E. coli*) や代表的土壌細菌シュドモナス (*P. putida*) に移行し、カナマイシン耐性を獲得しうるかを検討した。最も単純な実験系として、pML4 とその適切なホストである大腸菌 RR1 との共存によって、大腸菌 RR1 が形質転換するか調べるために、菌の状態としてもっとも形質転換し易い対数増殖期に pML4 と RR1 を共存させて形質転換するか検討した。その結果、RR1 がカナマイシン耐性を獲得する頻度は 9×10^8 個に 1 個未満であることが示された。また、最も形質転換しやすいエレクトロポレーション法を用いても、pML4 によりシュドモナスがカナマイシン耐性を獲得する頻度は、 2.8×10^8 個のうち 1 個未満であることが示された。

さらに、遺伝子導入ゼブラフィッシュを用いて、遺伝子導入魚から外来性遺伝子が腸内細菌に移行する可能性を検討した。①遺伝子導入ゼブラフィッシュの糞、②好気培養あるいは嫌気培養した腸内細菌、③死亡した遺伝子導入ゼブラフィッシュから周辺の細菌への移行の 3 条件について検討した結果、Km 耐性菌が多数存在することが示された。しかし、その中に導入遺伝子の移行は確認されなかった。(pML4 保持菌比率 10^{-3} – 10^{-6} 以下)

従来、遺伝子組み換え動物からの周辺微生物への遺伝子移行は、ほとんど調べられていない。本研究において初めて、周辺微生物への移行が極めて起こりにくいことを定量的に示すことができた。

[キーワード] 遺伝子導入魚、腸内細菌、土壌細菌、薬剤耐性、遺伝子移行

1. はじめに

遺伝子組換え生物の開放系利用のうち、遺伝子組換え家畜の利用はかなり遅れるものと考えられていた。しかし、グリーンフルオレッセンスタンパク質を全身で発現する遺伝子組換えメダカ（いわゆる「光るメダカ」）が今般輸入され、家畜よりもむしろ遺伝子組換えを行った観賞魚の開放系利用への対応が、現実には迫られる課題となった。実際、メダカの他にも、強い蛍光を発するゼブラフィッシュが開発され、海外では商品化されている。

遺伝子組換え魚が開放系で利用された場合、次の3つの問題が考えられる。

- 1) 遺伝子組換え魚の環境水中での繁殖が、生物多様性に影響を及ぼし、在来の生物種が減少すること。
- 2) 魚に導入した遺伝子に起因する遺伝形質が、在来種との交配により在来種に伝搬していくこと。また、遺伝子組換え魚の色・大きさといった形質が繁殖に有利になり、遺伝形質の伝搬が起こりやすくなること。

3) 遺伝子組換え魚のゲノム DNA に導入された外来性遺伝子が、土壌細菌や魚の腸内細菌に移行し、新たな形質を獲得すること。またこれにより、環境微生物の多様性に影響を及ぼすこと。本サブテーマでは、魚のゲノム DNA に導入された外来性遺伝子が、微生物に移行する可能性を検討する。外来性遺伝子が微生物に移行する機序として、①外来性遺伝子が魚の腸内で腸内細菌に取り込まれ、環境中に放出されること、②魚の組織から遊離したゲノム DNA の断片が土壌細菌等に取り込まれることが考えられる。

我々はすでに、水環境中に存在する変異原物質の検出を意図し、*rpsL* トランスジェニックゼブラフィッシュ系統を作出した [1]。本系統には、大腸菌のカナマイシン耐性を決定する遺伝子 KanR とストレプトマイシン感受性を決定する遺伝子 *rpsL* が載ったプラスミド pML4 (図 1) が導入されている。導入遺伝子が抗生物質耐性遺伝子であるため、本系統は遺伝子導入魚から細菌への遺伝子の移行を明らかにするモデル系として適している。

本研究では、カナマイシン耐性遺伝子を含む導入遺伝子 pML4 がゼブラフィッシュの腸内細菌や環境中に生息する細菌に取り込まれる可能性について検討した。この実施は *rpsL* トランスジェニックゼブラフィッシュの開放系利用に伴う安全性を評価する上でも重要である。

2. 研究目的

rpsL トランスジェニックゼブラフィッシュのゲノム DNA には、導入遺伝子として pML4 プラスミド (図 1) が細胞あたりにして約 350 コピー含まれている [1]。これらは、染色体の一方所に、同一方向に縦につながって (head-to-tail) 組み込まれていると考えている。染色体に組み込まれていることにより、このトランスジェニック魚は系統として維持することが可能であり、我々は既に 8 代以上にわたって系統維持を続けている。その際に、導入遺伝子が多コピー数を保っていることは dot hybridization により確認しているが、10—数 10 個体に 1 個体くらいの割合でコピー数が激減した魚が検出される。このような導入遺伝子コピー数の減少が起こる時期やメカニズムについては不明であり、導入遺伝子の断片が染色体から脱落する可能性も否定できない。このような断片が細胞内にできてしまっても、ほとんどは分解されてしまうと考えられるが、ごくまれにプラスミドの形をとって細胞外に出てしまうものがあるかもしれない。

本研究では pML4 が土壌細菌に取り込まれる可能性について検討し、さらに、我々が開発した遺伝子導入ゼブラフィッシュを用いて、プラスミドが有する薬剤耐性の性質がゼブラフィッシュの腸内細菌に移行する可能性を、1) 腸内細菌はフンとして排泄されるため、フンから抽出される DNA 中に導入遺伝子 (pML4) が検出されるか、2) 腸内細菌を培養し、カナマイシン耐性菌を分離し、腸内細菌の DNA 中に pML4 が検出されるかを明らかにすることにより検討した。また、死んだ遺伝子導入ゼブラフィッシュから環境水中の細菌への pML4 の移行の可能性も検討した。

3. 研究方法

(1) pML4 プラスミドが細菌へ移行する可能性の検討

遺伝子導入魚から生じてしまう可能性のあるプラスミドとして、遺伝子導入に用いたプラスミド pML4 そのものを用いた。薬剤耐性が移行する対象としては、まず魚の細胞の最も近くに生存している魚の腸内細菌が考えられるので、これに匹敵する微生物として *in vitro* で培養でき、かつ本プラスミドで形質転換効率のよい大腸菌 RR1 を用いて検討した。また、水中や土壌中に存在する細菌への移行の可能性の検討のためには、代表的な環境中の細菌であるシュードモナス (*Pseudomonas putida*) PpY101 を用いた。

表 1 に実験に用いたプラスミドと、それが増殖可能な宿主を示す。

表 1 実験に用いたプラスミドと宿主

プラスミド	サイズ	増幅可能な宿主	マーカー
pML4 (導入遺伝子)	3.0kb	<i>E. coli</i> (RR1)	KmR
pKT230	11.9kb	<i>P. putida</i> (PpY101) <i>E. coli</i> (RR1)	KmR, SmR
pSUP104	9.5kb	<i>P. putida</i> (PpY101)	CmR, TcR

KmR: カナマイシン耐性、SmR: ストレプトマイシン耐性、

CmR: クロラムフェニコール耐性、TcR: テトラサイクリン耐性

エレクトロポレーションの方法：特に記述してある以外は、シュードモナスについては、岩崎らの論文 [3] に従って、大腸菌 (RR1) については、権藤ら [2]、天沼ら [1] の論文に従って行った。すなわち、バイオラッド社の装置 *E. coli* パルサーを用い、電極幅 0.1mm のキューベットにて電圧 1.8kV で行った。電圧をかけた後の菌は、できる限り速やかに SOC 培地に懸濁し、大腸菌は 37℃ で 70 分、シュードモナスは 30℃ で 2 時間振とう培養後、必要に応じて希釈して適切な選択培地に播種した。

(2) フンから抽出される DNA 中に存在する導入遺伝子の検出

pML4 の配列を増幅するプライマー (図 1) を用い、フンから抽出した DNA を PCR 増幅したとき、同じサイズの DNA が増幅するかを調べた。フェノール抽出法で調製した DNA では、PCR 反応が阻害されてしまったが、キアゲン社製のフン用の DNA 抽出キットによって調製した DNA を使用する

ことで、PCR フラグメントを増幅することが出来た。

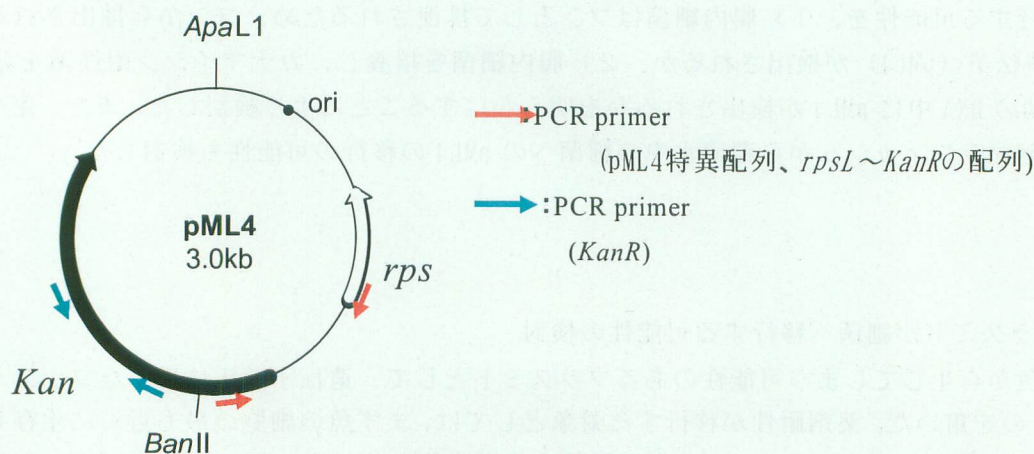


図1 pML4 プラスミド

(3) ゼブラフィッシュ腸内細菌の培養、分離、導入遺伝子の確認

腸内細菌の培養・分離に用いる培地、温度条件は Rawls らの方法 [4] と同様にした。

遺伝子導入ゼブラフィッシュのフンを採取し、Brain Heart Infusion (BHI)、Nutrient Broth (NB) および Sabouraud Dextrose Broth (SD) を用いて、それぞれ Km^+ (50 μ g/ml) と Km^- プレート作成して腸内細菌を 28℃あるいは 37℃で 1-3 日間好気培養した。 Km 耐性菌のコロニーを純粋分離し、グリセロールストックを作成する一方、 Km plate に生えた colony を全部かき取りグリセロールストックを作成した。PCR にて導入遺伝子の配列が存在するか調べ、pML4 に特異的な配列と *KanR* の存在する微生物を同定した (図 2)。

ゼブラフィッシュ腸管の内容物の嫌気培養は、嫌気グローブボックス内で分離作業を行ったのち、 H_2 、 CO_2 を充填した GasPak (BBL 社製) 中において行った。10 株ずつまとめて pML4 をターゲットとした colony direct PCR を行った。

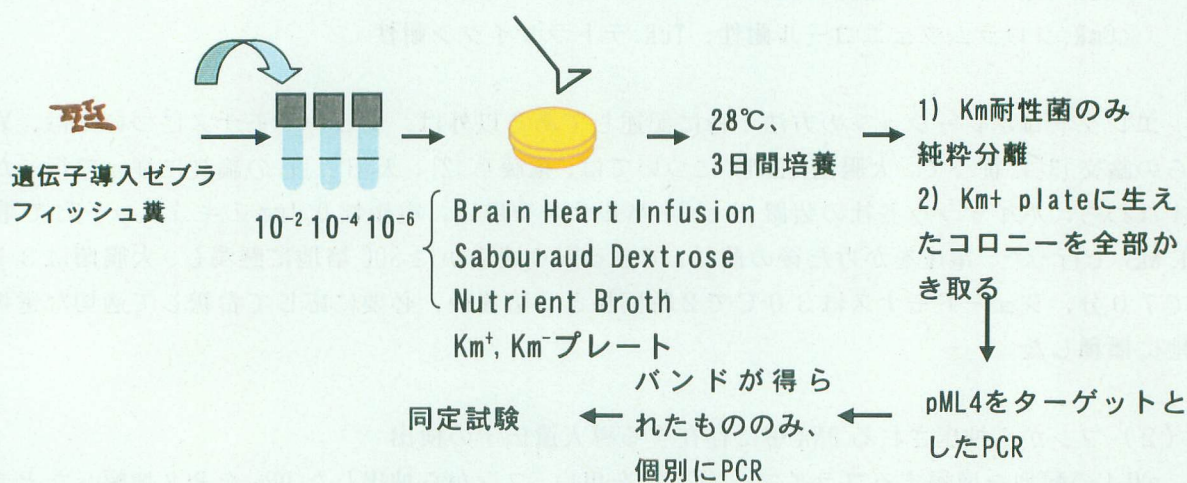


図2 遺伝子導入ゼブラフィッシュ糞からの Km 耐性菌株の分離法

(4) 死んだゼブラフィッシュから周辺環境中の細菌への導入遺伝子の移行

氷冷死した遺伝子導入ゼブラフィッシュの腹部周辺を約 25mg 採取してゼブラフィッシュ飼育水 (0.1%人工海水) 中で7日間室温にて放置した後、放置前と放置後の魚体採取し、適宜希釈し、BHI、NB および SD を用いて、それぞれ Km⁺と Km⁻プレート作成して 28℃で3日間好気培養した。Km 耐性菌株を約 900 株回収した (図3)。

霞ヶ浦湖水を入れたマイクロコズム (20℃、60 rpm、暗所) 中にも、死んだゼブラフィッシュ (遺伝子導入魚について N=2、野生型について N=2、無添加 N=2) を放置し、10、20、40 日目に水をサンプリングした。BHI、NB および SD を用いて、それぞれ Km⁺と Km⁻プレート作成して 30℃で3-5 日間培養し Km 耐性菌を約 1600 株分離した。

ともに得られた Km 耐性菌を 10 菌株ずつ (OD₆₀₀=1、1ml) まとめて、pML4 をターゲットとした PCR を行い、バンドが得られたもののみの個別の菌株について PCR を行った。

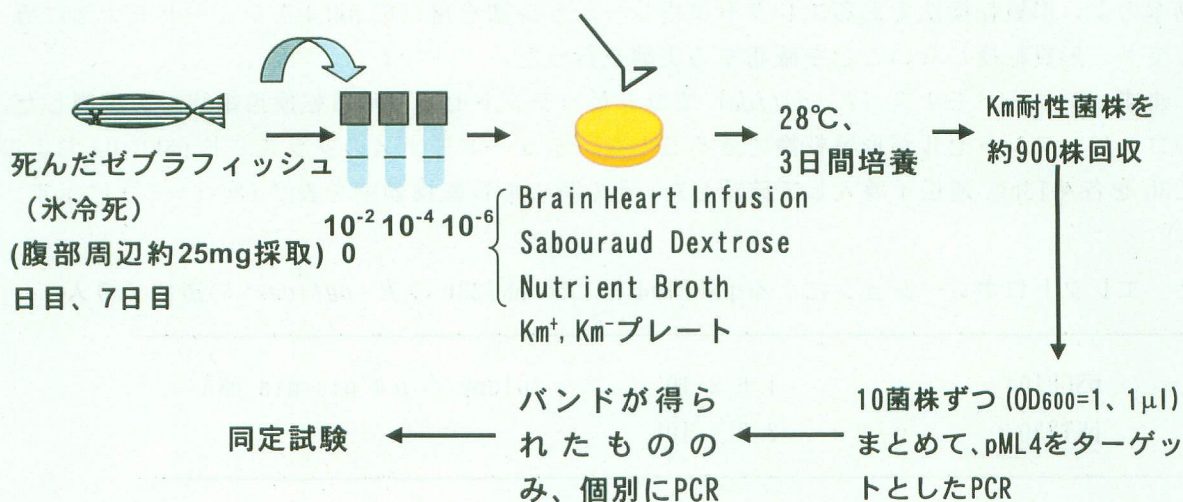


図3 死んだ遺伝子導入ゼブラフィッシュからの Km 耐性菌株の分離法

4. 結果・考察

(1) pML4 の薬剤耐性が、ふつうの状態の大腸菌 RR1 に移る可能性の検討

pML4 はカナマイシン耐性遺伝子を有し、大腸菌 RR1 はカナマイシン感受性であるため、薬剤耐性が移ったかどうかは、大腸菌 RR1 がカナマイシンを含むプレートにコロニーを形成するかどうかで確認できる。つまり、pML4 と大腸菌 RR1 との共存によって、大腸菌 RR1 が形質転換するか調べればよい。単なる共存による形質転換頻度は非常に低いことが予想されるので、菌の状態として、もっとも形質転換しやすいと考えられる対数増殖期に pML4 を共存させて形質転換するか検討した。

まず、本実験に使用した pML4 が本当に RR1 を形質転換できることを確認するために、エレクトロポレーション法により pML4 を RR1 に導入した。その結果、カナマイシン耐性コロニー数がプラスミド DNA 1μg あたり 1.6×10^{10} という非常に高い形質転換効率が得られ、確かに形質転換でき

ることが確認された。

次に、LB 培地中で対数増殖期にある大腸菌 RR1 (1×10^9 個) に対して、pML4 をそれぞれ 50ng, 1 μ g, 50 μ g 加えて 37℃ で 3 時間振とう培養し、RR1 が形質転換したかどうか、カナマイシン含有プレートに菌を播種することにより調べた。その結果、RR1 約 9×10^8 個のなかでカナマイシン耐性コロニーはまったく現れず、魚の腸内細菌よりも、はるかに形質転換しやすいと考えられる RR1 でさえ、共存下での形質転換の頻度は 9×10^8 個に 1 個未満であることが示された。

(2) pML4 が環境中の代表的な細菌であるシュードモナスを形質転換する可能性の検討

自然界で落雷による電気ショックによって、魚の体外に出た pML4 が環境中の細菌にとりこまれることがあるかもしれない。仮に、そういうことが起こっても、pML4 には大腸菌内で増殖するための複製起点しかないので、シュードモナスを形質転換することはないはずである。そこで、最も効率のよい形質転換法であるエレクトロポレーション法を用いて pML4 をシュードモナスに導入しても、形質転換しないことを確認する実験を行った。

① まず、シュードモナス (*P. putida*) でコンピーテントセル (形質転換用細胞) を調製した。このコンピーテントセルが形質転換できることを、シュードモナスのプラスミド pSUP104 および pKT230 を各々 13ng、遺伝子導入して確認した。その時の形質転換効率を表 2 (次ページ) に示す。

表 2 エレクトロポレーションによる pSUP104 および pKT230 の *P. putida* への遺伝子導入

pSUP104	1.6×10^7	colony / μ g plasmid DNA
pKT230	2.0×10^4	

シュードモナス (生菌数 1.95×10^8) に遺伝子導入

② pML4 がシュードモナスを形質転換しないかどうか、シュードモナスのコンピーテントセル (生菌数 9.8×10^8) に、実験 1) で調製した pML4 (大腸菌 RR1 を形質転換できることを確認済み) (25ng)、あるいは陽対照として pKT230 (3.8ng) を混合して、エレクトロポレーション法により遺伝子導入し、カナマイシン培地に形成されたコロニーを数えることにより調べた。その結果を表 3 に示す。

表 3 エレクトロポレーションによる pML4 の *Pseudomonas putida* への遺伝子導入

プレートにまいた 2.8×10^8 個の細胞のうちコロニーを形成した数	
pML4	0
pKT230	2598

pKT230 は陽対照。形質転換効率 2.0×10^4 colony / μ g plasmid DNA

最も形質転換しやすいエレクトロポレーション法を用いても、pML4 による形質転換の頻度は、シュードモナス 2.8×10^8 個のうち 1 個未満であることが示された。

(3) フンから抽出される DNA 中に存在する導入遺伝子の検出

遺伝子導入魚のフン由来 DNA 中には、pML4 特異配列が存在した (図 4)。フンを顕微鏡で観察すると、ソーセージ状に薄い膜で包まれており、この膜は魚由来と考えられる。また、腸管上皮細胞は代謝回転が速く、腸管内に脱落することが知られている。よって、検出された pML4 配列は、フンに棲息していた腸内細菌由来ではなく、遺伝子導入魚由来と考えられる。

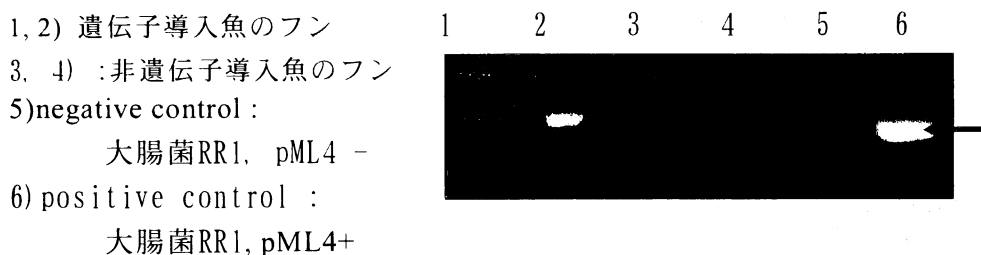


図 4 フン中の DNA に存在する pML4 特異配列の PCR による検出

(4) ゼブラフィッシュのフン中細菌の培養、分離、導入遺伝子の確認

微生物の総菌数 (Brain Heart Infusion Km- (28℃) 生育菌株、20 時間後カウント) は 6.7×10^{11} / フン乾燥重量 (g) であった。表 4 に培養 3 日後にカウントした Km 耐性菌数を示す。

表 4 フン中のカナマイシン耐性菌数

	28℃	37℃
Nutrient Broth	1.3×10^4 ①	2.2×10^3 ④
Sabraud Dextrose	1.0×10^4 ②	6.0×10^2 ⑤
Brain Heart Infusion	5.9×10^4 ③	1.4×10^4 ⑥

全てのプレートにおいて 28℃ 条件で生育が良かった。Sabraud Dextrose のみ 2、3 日目で菌数が増加したが、他は 1 日目以降変わらなかった。生育菌数が多いので、1) 各プレートから形態の異なるコロニーを 50 個ひろって純培養し、PCR を行った (図 5)。また 2) コロニーを全てかき取り (サンプル①-⑥) PCR を行った (図 6)。

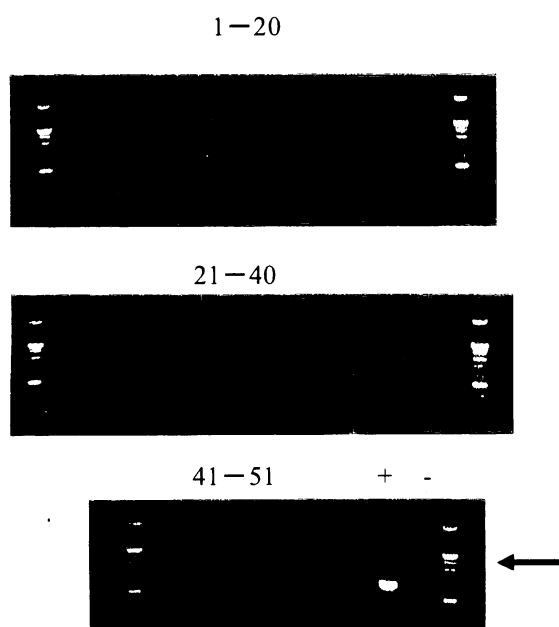
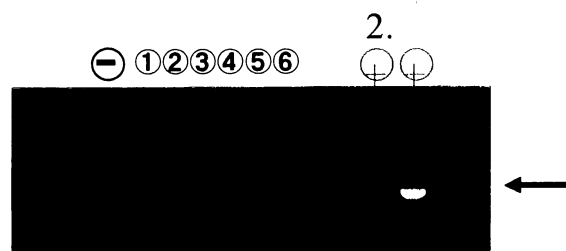
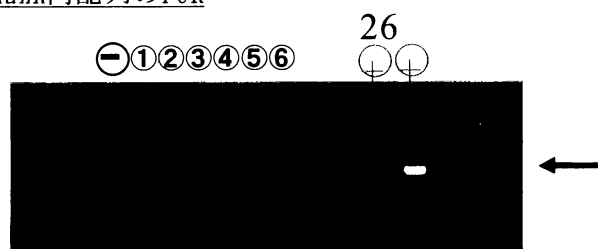


図5 PCRによるpML4特異配列の検出(分離培養した菌の場合) Brain Heart Infusionより25株(13-37)、Nutrient Brothより12株(1-12)、Sabraud Dextroseより14株(38-51)
+、negative control、大腸菌pML4(+); -, negative control、大腸菌pML4(-)

pML4特異配列のPCR



KanR内配列のPCR



- : negative control、+ : positive control、2.6 : 2.6 cells/tube、26 : 26 cells/tube

図6 PCRによるpML4特異配列の検出(かき取ったサンプルの場合) 3種類の培地(Km含有、28℃あるいは37℃培養)からかき取ったサンプル①-⑥をPCR

純培養（図 5）、あるいはコロニーを全てかき取った場合（図 6）ともに pML4 に特異的な DNA の増幅は見られなかった（*rpsL*～*KanR* の配列、*KanR* 内の配列どちらも）。分離菌株には、遺伝子導入ゼブラフィッシュからのプラスミドの移行は確認されなかった。

（5） 死んだ遺伝子導入ゼブラフィッシュから周辺の細菌への導入遺伝子の移行

① ゼブラフィッシュ飼育水中での放置

死んだ遺伝子導入ゼブラフィッシュ組織から分離した Km 耐性菌数（総菌数、Km 耐性菌数）を図 7 に示す。死んだ直後の組織より、7 日目の腐敗組織から培養した菌の方が、Km 耐性菌数が多かった。それぞれ分離した約 300 株について PCR を行い pML4 の移行の有無を調べたところ、pML4 保持菌株は検出されず、その保持菌株の比率は 10^{-3} ～ 10^{-6} レベル以下であった（表 5）。

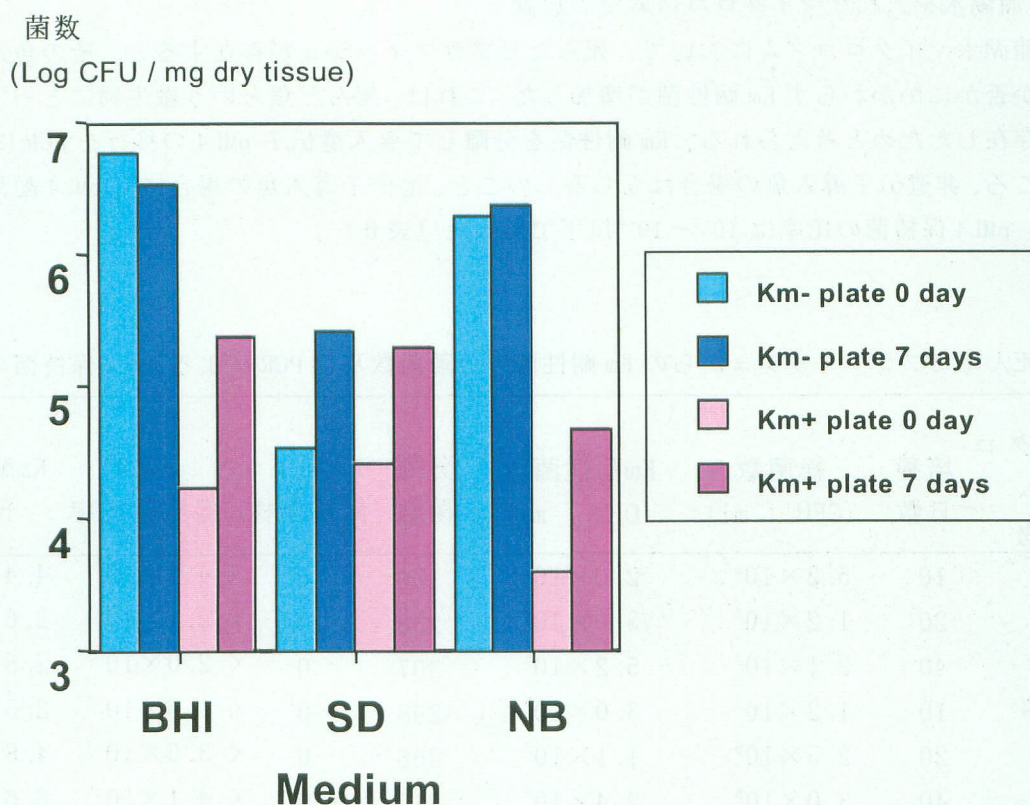


図 7 死んだ遺伝子導入ゼブラフィッシュ組織からの Km 耐性菌の分離（総菌数、Km 耐性菌数）

表5 Km 耐性菌の分離菌数及び PCR による pML4 保持菌株の検出

Medium	総菌数 (CFU / mg dry tissue)	Km耐性菌数 (CFU / mg dry tissue)	分離 菌数	pML4 保持菌株	pML4 保持菌比率	Km耐性菌 比率
BHI (0日目)	6.3×10^6	1.8×10^4	310	0	$< 9.4 \times 10^{-6}$	2.9×10^{-3}
(7日目)	3.5×10^6	2.4×10^5	310	0	$< 2.2 \times 10^{-4}$	6.9×10^{-2}
SD (0日目)	3.6×10^4	2.7×10^4	262	0	$< 2.8 \times 10^{-3}$	7.4×10^{-1}
(7日目)	2.7×10^5	2.0×10^5	302	0	$< 2.4 \times 10^{-3}$	7.3×10^{-1}
NB (0日目)	2.0×10^6	4.1×10^3	310	0	$< 6.7 \times 10^{-6}$	2.1×10^{-3}
(7日目)	2.4×10^6	4.8×10^4	310	0	$< 6.4 \times 10^{-5}$	2.0×10^{-2}

② 霞ヶ浦湖水を入れたマイクロコズムでの放置

霞ヶ浦湖水マイクロコズムにおいて、死んだゼブラフィッシュが存在すると、その魚が遺伝子導入魚か否かにかかわらず Km 耐性菌が増加した。これは、死んだ魚という微生物にとっての栄養物質が存在したためと考えられる。Km 耐性菌を分離して導入遺伝子 pML4 の移行を PCR により調べたところ、非遺伝子導入魚の場合はもちろんのこと、遺伝子導入魚の場合にも pML4 配列は検出されず、pML4 保持菌の比率は 10^{-3} ~ 10^{-4} 以下であった（表6）。

表6 死んだゼブラフィッシュからの Km 耐性菌の分離菌数及び PCR による pML4 保持菌の検出

マイクロ コズム 添加物	培養 日数	総菌数 (CFU / ml)	Km耐性菌数 (CFU / ml)	分離 菌数	pML4 保持菌株	pML4 保持菌比率	Km耐性菌 比率
Tg魚	10	5.2×10^6	2.0×10^5	169	0	$< 4.1 \times 10^{-4}$	4.4×10^{-2}
	20	1.2×10^6	3.0×10^4	238	0	$< 2.1 \times 10^{-4}$	2.6×10^{-2}
	40	2.1×10^6	5.2×10^5	307	0	$< 2.0 \times 10^{-3}$	2.8×10^{-1}
Non-Tg 魚	10	1.2×10^7	3.0×10^5	298	0	$< 1.6 \times 10^{-4}$	2.5×10^{-2}
	20	2.5×10^6	1.1×10^5	266	0	$< 3.6 \times 10^{-4}$	4.8×10^{-2}
	40	3.0×10^6	2.4×10^6	319	0	$< 4.1 \times 10^{-3}$	6.6×10^{-1}
無し	10	3.7×10^4	5	0	ND	ND	1.3×10^{-4}
	20	2.6×10^4	2.5×10^1	0	ND	ND	9.8×10^{-4}
	40	5.8×10^4	5	0	ND	ND	7.8×10^{-5}

ND: Not determined.

Tg 魚: : 遺伝子導入魚

non-Tg 魚: : 非遺伝子導入魚

5. 本研究により得られた成果

遺伝子導入ゼブラフィッシュにおいて、腸内細菌はフンとして排泄されると考えられるが、フンから抽出される DNA 中に導入遺伝子が検出された。この導入遺伝子は、腸内細菌由来ではなく、遺伝子導入魚の細胞由来であると考えられた。腸内細菌を好気培養すると、カナマイシン耐性コロニーが 10^4 /g フン乾燥重量のオーダーで生育してきたが、その一部を分離培養した菌株、および、全部まとめてかきとったサンプルどちらにも、導入遺伝子は検出されなかった。さらに、腸より嫌気培養し Km 耐性菌を分離したが、導入遺伝子保持菌は検出されなかった。保持菌比率は 10^{-5} 以下であった。

死んだ遺伝子導入魚から導入遺伝子が出てくる可能性についても検討した。死んだ直後の組織及び7日後の腐敗組織から好気培養した菌を比較すると、後者のほうが Km 耐性菌数が多かった。しかし、死んだ直後と7日後のどちらの Km 耐性菌にも、導入遺伝子保持菌は検出されなかった。保持菌比率は 10^{-3} – 10^{-6} 以下であった。

さらに、霞ヶ浦湖水マイクロコズム中に放置した導入遺伝子ゼブラフィッシュから周辺の微生物への移行を検討した。死んだ遺伝子導入魚あるいは非遺伝子導入魚を添加した霞ヶ浦湖水マイクロコズムの培養液を好気培養した結果、どちらの魚を添加した場合でも Km 耐性菌数は同程度であり、それぞれ経時的な増加が見られたが、導入遺伝子保持菌は検出されなかった。保持菌比率は 10^{-3} – 10^{-4} 以下であった。

以上のように、遺伝子移行の可能性のある様々なケースを想定し、腸内細菌や周辺微生物への移行が起こりにくいことを定量的に示すことができた。しかしながら、細菌間での遺伝子組換えが自然に起こる確率は 10^{-6} 以下といわれているため、遺伝子組換え魚から細菌への遺伝子の移行が起こらないことを確認するためには、試験の例数を上げ、さらに低頻度でしか起こらないことを示す必要がある。

6. 引用文献

1. Amanuma, K., Takeda, H., Amanuma, H. and Aoki, Y. (2000) Transgenic zebrafish for detecting mutations caused by compounds in aquatic environments. *Nat. Biotech.*, 18, 62-65.
2. Gondo, Y., Shioyama, Y., Nakao, K. and Katsuki, M. (1996) A novel positive detection system of in vivo mutations in *rpsL* (*strA*) transgenic mice. *Mutat. Res.*, 360, 1-14.
3. Iwasaki, K., Uchiyama, H., Yagi, O., Kurabayashi, T., Ishizuka, K. and Takamura, Y. (1994) Transformation of *Pseudomonas putida* by electroporation. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 851-854.
4. Rawls J.F. et al, (2004) Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101, 4596-4601.

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

査読無し

・青木康展

組換え魚飼育管理の問題 (2006) 海洋と生物 28 (2), 158-163

(2) 口頭発表

・橋本顯子, 天沼喜美子, 岩崎一弘, 青木康展

rpsL トランスジェニックゼブラフィッシュの組換え遺伝子は周辺微生物へ移行するか? 第126 年会日本薬学会, 仙台, 2006 年 3 月

(3) 特許出願

なし

(4) シンポジウム・セミナーの開催

なし

(5) マスコミ等への公表・報道等

なし

9. 成果の政策的な寄与・貢献について

遺伝子導入魚から腸内細菌や環境水中の微生物への導入遺伝子の移行は極めて起こりにくいことが明らかとなり、遺伝子導入魚の安全性評価に一つの指針を与えることが出来た。また、本研究で実施した試験を基に、遺伝子組換え魚から細菌への遺伝子移行を確認する手法を確立していくことが出来る。