

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26281027

研究課題名(和文) ヒト型核内受容体導入ミジンコを用いた化学物質影響評価法の確立

研究課題名(英文) Introduction of human nuclear receptors into Daphnia for chemical monitoring of water environment

研究代表者

渡辺 肇 (Watanabe, Hajime)

大阪大学・工学研究科 教授

研究者番号：80212322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,200,000円

研究成果の概要(和文)：環境中の化学物質影響が懸念されるカテゴリーのひとつとしてホルモン様化学物質があげられる。中でもステロイドホルモンは代表的なものであり高い関心を集めている。この受容体であるヒト由来の核内受容体であるエストロゲン受容体をミジンコに導入し、水中のエストロゲン様化学物質を簡便に検出できる系の確立をめざした。すでに確立した遺伝子導入系を改良しポジションエフェクトなしに効率的に外来遺伝子を導入する系を確立し、この系を用いてヒト型核内受容体とその応答遺伝子の導入を行った。さらにこのヒト型遺伝子導入ミジンコを用いて実際に曝露を行い、導入遺伝子応答性を検証した。

研究成果の概要(英文)：We successfully designed and integrated a human derived estrogen biosensor construct into the Daphnia magna genome. The resulting line expresses functional human estrogen alpha and its reporter gene exhibits fluorescence responses to exposure to both natural and synthetic estrogens as tested with E2 and DES. Sensitivity must be improved for practical application for environmental monitoring, either by changing the exposure javascript: onTransientSave() regment or the genetic cassette, e.g. by replacement of mCherry with a brighter fluorescent protein like tdTomato, or the introduction of human coactivators like SRC-1, SRC-3 and LRP16. Nevertheless, human estrogen receptor could be shown to be functional in daphnia for the first time, suggesting a huge potential for the use of daphnia to study the interaction of human genes with environmental factors like the effect of EDCs in this study.

研究分野：環境生物学

キーワード：ミジンコ 緑色蛍光タンパク質 エストロゲン エストロゲン受容体 バイオモニタリング レポーター遺伝子

1. 研究開始当初の背景

地球環境への関心が急速に高まりつつある中で、社会活動にともない放出された化学物質の環境への負荷を的確に評価することは火急の課題である。特に人を含めて生態系を構成する生物に対する影響を評価するためには、単なる環境中の化学物質の分析・定量ではなく、生物を利用した簡便かつ的確に評価するための手法の開発が重要である。しかし今や化学物質の数は増加の一途をたどり、ケミカルアブストラクトに登録されている化学物質は7000万種を超えている。さらに、より現実の曝露に近い複合曝露影響を考慮した場合、評価すべき化学物質の数と組み合わせは膨大なものになっており、安価でハイスループットな手法の開発が必要とされている。

従来化学物質影響評価法は、精製した個々の化学物質について *in vivo* と *in vitro* のバイオアッセイ系を用いて評価するのが一般的であった。*in vivo* バイオアッセイ系としては、いわゆる生体影響評価ではラット等モデル生物を利用するほか、生態影響評価の場合、藻類、ミジンコ、魚類などの生物個体が利用されてきている。生物個体を利用 *in vivo* の場合、化学物質の全体的な影響を評価できるメリットがある反面、その作用機序の解明は非常に困難を伴う。一方では *in vitro* バイオアッセイ系として培養細胞系も様々な局面で利用されてきている。培養細胞系の利点としては、レポーター系を利用できることがあげられる。種々の化学物質に反応する遺伝子の制御領域の下流にレポーター遺伝子を組み込むことにより、化学物質の曝露評価が可能となり、作用点についても明確となる。例えば非常にコストと時間のかかるダイオキシンの機器測定に加えて培養細胞レポーター系が公定法として認められている。この場合、必ずしも宿主細胞の生物種に依存せず、導入した遺伝子(産物)への作用を解析できる長所も有している。特に海外では近年、動物愛護の高まりから脊椎動物を用いた実験が非常に厳しくなっており、代替法の実験が求められている。そこで本研究では、取り扱いの容易な個体に培養細胞の利便性を組み込んだトランスジェニックミジンコを作製し化学物質影響評価に利用する。

ミジンコは環境指標生物として古くから利用され、化学物質の生態影響評価のためのガイドラインにも指定されているが、近年まで遺伝子レベルの解析が困難であった。しかしミジンコにおける発現遺伝子の解析に端を発し(Watanabe et al.2005 Genome 48: 606-609)、ゲノム配列の解析、遺伝子ノックダウン技術の開発(研究成果 12)、トランスジェニックミジンコの開発(研究成果 5、15)などが我々の研究室を中心に進められ、ミジンコにおいても化学物質影響を作用機序の面からアプローチ可能な基盤が整ってきている。現時点で外来遺伝子としては緑色および

赤色蛍光タンパク質をマーカー遺伝子として発現させることに成功し、内在性のホルモン応答性の遺伝子制御領域を用いたマーカー遺伝子の発現にも成功している(Asada et al. Marine Environ. Res. 修正稿再投稿中)。また遺伝子のノックアウトにも成功したところであり(Nakanishi et al. PLoS ONE 投稿中)、まさにミジンコをモニタリング用ツールとして利用できる体制が整ったところである。

2. 研究の目的

化学物質の作用点は非常に多岐にわたるが、低用量で影響のある化学物質の範疇のひとつとしてホルモン様化学物質があげられる。中でもステロイドホルモンは代表的なものであり高い関心を集めているが、この受容体は核内受容体として知られている。ところがヒトで機能している核内受容体はミジンコには存在していない。そこで本研究では、核内受容体を中心とするヒト型化学物質応答システムをミジンコに導入し、その検証を行う。すでに確立した遺伝子導入系を改良し遺伝子導入効率の向上を図り、ポジションエフェクトなしに効率的に外来遺伝子を導入する系を確立し、この系を用いてヒト型化学物質応答系の導入を行う。ヒト型化学物質応答系のモデル遺伝子としては、核内受容体およびアрилヒドロカーボン受容体を選択し、これらのヒト型化学物質応答遺伝子を有するミジンコを作製する。これらヒト型遺伝子導入ミジンコを用いて実際に曝露を行い、導入遺伝子応答性を検証し、必要に応じてその応答性の向上を図る。またこれらと並行して、化学物質曝露評価のハイスループット化を目指す。これにより、多数の化学物質影響を効率的に評価するためのシステムを構築する。

3. 研究の方法

ヒト型核内受容体をミジンコに導入するために、まず遺伝子導入法の効率化を行い、バクテリオファージのインテグラーゼを用いて効果的に外来遺伝子を導入する手法を開発する。この技術を用いて、ヒト型核内受容体とそのレポーター遺伝子をミジンコに導入する。核内受容体としてはまずエストロゲン受容体を導入し2種類のレポーター系を構築し応答性を検討した後に、一連の核内受容体やアрилヒドロカーボン受容体などを導入する。レポーター遺伝子としては緑色蛍光タンパク質を用い化学物質曝露を定量的に検出する系を構築し、この系を用いて種々の化学物質に対する応答性を明らかにする。またこれら一連の研究と並行して、曝露とバイオアッセイのハイスループット化をすすめる。

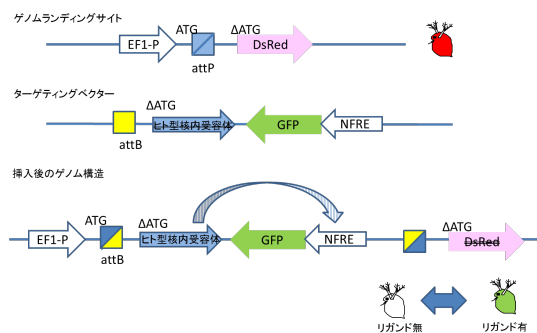
平成26年度

(1) 遺伝子導入法の効率化(渡邊 および大学院生1名が担当)

我々は世界に先駆けすでにミジンコの遺伝子改変技術を確認しているが、現在はミジンコの非同相組換えを利用している。このため遺伝子導入効率は1%程度であり、いまだ労力を要するステップとなっている。また遺伝子挿入部位を制御できないために、同じ遺伝子断片を導入しても遺伝子のコピー数を制御できず、その発現状態が系統によって異なるなど、挿入部位による位置効果の影響も受けやすい。こうした問題点を克服するためにまずバクテリオファージ phiC31 インテグラーゼを用いて非同相組換えによる遺伝子導入技術を確認する。(1) 非同相組換えの標的となる phiC31 の attP 由来配列を有するランディングサイト DNA を我々が開発した手法により、ミジンコゲノムに導入し複数系統のトランスジェニックミジンコを作製する。(2) 非同相組換えに必要な attB 配列をもつテスト遺伝子を構築し、phiC31 リコンビナーゼの mRNA とともにミジンコの卵に顕微注射し、導入効率を評価する。定法により attP 配列をもつトランスジェニックミジンコを作製できなかった場合には、Cas9/CRISPR のシステムを用いて導入を試みる。Cas9/CRISPR は最近開発された効率的な遺伝子変異導入が可能なシステムであり、ミジンコにおいても応用可能な技術であることをつい最近に明らかにしており(Nakanishi et al. PLoS ONE 投稿中)、非同相組換えも一定の効率で起きることが考えられる。

(2) ヒト型核内受容体の導入(渡邊 および大学院生1名が担当)

ヒト型の化学物質応答をモニターできるよう、まずリガンド依存性核内受容体からヒト型エストロゲン受容体を対象として下記 a, b の2つの方法を用いてミジンコに導入する。



NFRE: 核内受容体応答配列 例えば4回繰返しのエストロゲン受容体応答配列。研究計画(5)では、それぞれの核内受容体に対応する応答配列を用いる。

(a) 完全ヒト型核内受容体の導入

完全長のヒト型エストロゲン受容体の cDNA を適切なプロモーターの下流で発現するように設計し、ミジンコに導入する。また、レポーター遺伝子としては、上流の制御領域に4回繰返しのエストロゲン受容体応答配列を有する緑色蛍光タンパク質(GFP)を導入

する。(必要に応じて赤色蛍光タンパク質などを用いる。)ミジンコ内で合成されたヒト型エストロゲン受容体は、リガンド依存的に応答配列に結合し、蛍光タンパク質の mRNA を合成、蛍光として検出が可能となる。この手法は化学物質による核内受容体全体の挙動を解析できる長所がある一方で、結合配列は核内受容体ごとに異なりその結合性も異なるため、種々の核内受容体を導入した場合に、反応性が大きく異なるというリスクを有する。

(b) ヒト型キメラ核内受容体の導入

核内受容体はリガンド結合領域と DNA 結合領域に分離できるだけでなく、DNA 結合領域を他の遺伝子の類似領域と入れ替え可能なことが古くから示されている。そこでヒト型核内受容体のリガンド結合領域と酵母由来の GAL4 遺伝子の DNA 結合領域を融合した遺伝子を利用する。Gal4DNA 結合領域は安定して DNA に結合することが知られていることから、キメラ核内受容体は純粋にリガンド結合部位の応答が解析可能になる。これら核内受容体と GAL4 のキメラは、実際に酵母内で機能することは先行研究によって確認されており(Nishikawa et al. Toxicol Appl Pharmacol. 1999 154:76-83.)、ミジンコにおいても機能することが予想される。

レポーター遺伝子は上記と同様に蛍光タンパク質を用い、レポーター遺伝子の上流の制御領域には GAL4 遺伝子応答配列を挿入する。これにより、リガンド依存的に活性化状態になったヒト型核内受容体は、融合された GAL4DNA 結合領域を介してレポーター遺伝子の制御領域に作用することが可能となり、リガンド依存的な転写活性化をレポーター遺伝子の発現としてとらえることが可能となる。

平成27年度以降

(3) コファクターの検討(渡邊 および大学院生1名が担当)

ヒト型核内受容体をミジンコに導入した場合に、転写活性化部位は当然ヒト由来になるが、このヒト型の転写活性化部位がミジンコの基本転写装置を効率的に活性化するかは前例もなく未知である。従来からの解析から異種の核内受容体を発現させる場合には、核内受容体と基本的な転写装置とを媒介するコファクターの種類や発現量がミジンコにおいても重要であることが我々の解析からわかってきている(Kato et al. J Endocrinol. 2007 193:183-94.)。そこで転写活性化効率を最大限にするためにミジンコ由来、もしくはヒト由来のコファクターをキメラ化、あるいはアミノ酸置換などにより改良して導入することにより、ヒト型核内受容体の応答の効率化を図る。

(4) ヒト型核内受容体導入ミジンコの評価(渡邊 および大学院生2名が担当)

ヒト型エストロゲン受容体を導入したミジ

ンコについて、既知のリガンドをはじめとして種々の化学物質曝露をおこない、その評価を行う。レポーター遺伝子の用量依存的な応答について検証し、ヒト型遺伝子の影響評価の妥当性について検証する。完全ヒト型核内受容体導入ミジンコとキメラ核内受容体導入ミジンコの応答性を比較し、安定して応答する導入方法を選択し、(5)以降の遺伝子導入の主たる方法とする。蛍光顕微鏡を用いてレポーター遺伝子の応答を確認するとともに、用量依存的な応答を確認するために、曝露後 RNA を抽出し、定量 PCR によってレポーター遺伝子の発現量を確認し評価する。一連の解析を行うことにより、ヒト型エストロゲン受容体に作用する可能性のある化学物質について、検出可能な濃度範囲を決定し、評価を行う。

(5) ヒト型核内受容体導入ミジンコの拡張と評価(渡邊 および大学院生2名が担当)
(4) で選択した手法により、エストロゲン受容体以外の一連のヒト型核内受容体とそのレポーター系をミジンコに導入する。生体外の化学物質の作用点としても知られている核内受容体を中心にアンドロゲン受容体、レチノイド受容体、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体、レチノイド X 受容体、プレグナン X 受容体、構成的アンドロスタン受容体やアрилヒドロカーボン受容体など順次遺伝子導入し、一連の化学物質応答性について検証する。
また実際のフィールドからのサンプル水などを用いて曝露を行い、フィージビリティーについて検証する。

(6) 化学物質影響評価法のハイスループット化(渡邊 および大学院生1名が担当)
本研究により作製したヒト型核内受容体導入ミジンコを効率的に利用するために、バイオアッセイのスマールスケール化を行いハイスループット化を目指す。従来法による急性毒性評価においては、ピーカー等を用いて一定数のミジンコを用いて必要があったが、これをマイクロプレートに移行させることにより、多数のサンプルの解析を可能とするための検討を行う。我々はミジンコのライブイメージングによりその生育状況をリアルタイムで評価することに成功しており(Suzuki et al. 修正稿再投稿中)、これを拡張することによりヒト型遺伝子を導入したミジンコについて、定量的に蛍光強度を測定しつつ生育状態をモニタリング可能なシステムを構築する。これにより多数の化学物質の曝露やフィールドにおける多数のコンポジット採水にも対応可能なシステムを目指す。すでに蛍光タンパク質を恒常的に発現するミジンコを保有しているため(研究業績5)、蛍光の定量化のための準備は平成 26 年度から開始する。

(7) 封じ込め手法の開発(渡邊 および大学院生1名が担当)

トランスジェニックミジンコはバイオアッセイのツールとして多くの可能性を有しているが、現時点では研究にあたり環境中に散逸しないよう細心の注意を払っている。今後、多くの研究室等で利用されるためには、簡便な封じ込め手法の開発が重要である。一連の化学物質応答性のミジンコを作製する過程と並行して、物理的、生物学的な封じ込め方法についてもさらに検討を加え、利便性の向上を目指す。例えば代謝関連遺伝子のノックアウトなどを行い、栄養要求性を付加するなど、安全に使用するための開発を行う。

3. 研究成果

(1) 遺伝子導入法の効率化

ミジンコの遺伝子操作が比較的困難であることから、この問題点を克服するためにまずバクテリオファージ phiC31 インテグラーゼを用いて相同組換えによる遺伝子導入技術の確立を目指した。この研究においては、相同組換えの標的となる phiC31 の attP 由来配列を有するランディングサイト DNA を CRISPR/Cas9 を用いた手法により、ミジンコゲノムに導入しトランスジェニックミジンコを作製する予定であった。attP 由来配列を有する DNA の微量注入は成功し一定数の個体が得られたものの、現在までに組換え体を得るには至っていない。この原因は不明であるが、微量注入の条件等を検討することで克服できると考えられる。

(2) ヒト型核内受容体の導入

完全長のヒト型エストロゲン受容体の cDNA を EF1 遺伝子のプロモーターの下流で発現するように設計し、ミジンコに導入した。EF1 遺伝子のプロモーターはミジンコの中でもその転写効率が高いことから、高い発現が期待できる。またレポーター遺伝子としては、上流の制御領域に4回繰り返しのエストロゲン受容体応答配列を有する赤色蛍光タンパク質遺伝子を用いた。

これら2種類の遺伝子を、相互に干渉しないよう逆向きにプラスミドに組み込んだ DNA を作製し、これをミジンコの卵に微量注入した。CRISPR/Cas9 を用いた手法により、ミジンコゲノムに導入しこの DNA を導入することに成功し、トランスジェニックミジンコを作製することができた。

(3) コファクターの検討

後述

(4) ヒト型核内受容体導入ミジンコの評価

ヒト型エストロゲン受容体を導入したミジンコについて、天然のエストロゲンであるエストラジオールおよび人工エストロゲンであるジエチルstilbestロールの曝露をおこない、その評価を行った。レポーター遺伝子の用量依存的な応答について検証し

た。蛍光顕微鏡を用いてレポーター遺伝子の応答を蛍光強度で確認するとともに、用量依存的な応答を確認するために、曝露後 RNA を抽出し、定量 PCR によってレポーター遺伝子の発現量を確認し評価した。その結果、エストラジオール、ジエチルスチルベストロールとも mM という比較的高い濃度でレポーター遺伝子の発現が観察された。

このため、ヒト由来のコファクターを数種類選択し、それぞれミジンコに導入しレポーター遺伝子の応答濃度を検討したが、反応性を顕著に向上させる因子の同定には至っていない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 22 件)

1. Mohamad Ishak, N. S., Nong, Q. D., Matsuura, T., Kato, Y., Watanabe, H. (2017) Co-option of the bZIP transcription factor Vrille as the activator of Doublesex1 in environmental sex determination of the crustacean *Daphnia magna*. PLoS Genetics PLoS Genet. 13(11):e1006953. doi: 10.1371/journal.gen.006953.)
2. Nong, Q., Mohamad Ishak, N. S., Matsuura, T., Kato, Y., Watanabe, H. (2017) Mapping the expression of the sex determining factor Doublesex1 in *Daphnia magna* using a knock-in reporter. Sci Rep, 7,: 13521 (2017) doi:10.1038/s41598-017-13730-4
3. Kumagai, H., Nakanishi, T., Matsuura, T., Kato, Y., Watanabe, H. (2017) CRISPR/Cas-mediated knock-in via non-homologous end-joining in the crustacean *Daphnia magna*. PLoS One, 18: e0186112. doi: 10.1371/journal.pone.0186112
4. Manakul P., Peerakietkhajorn S., Matsuura T., Kato, Y., Watanabe, H. (2017) Effects of symbiotic bacteria on chemical sensitivity of *Daphnia magna*. Marine Environmental Research, 128:70-75
5. Genome editing in the crustacean *Daphnia magna* using Crispr/Cas and TALEN systems Kato, Y., Nakanishi T., Watanabe H. (2017) Chapter 6, Genome Editing and Engineering, Ed. Appasani, K. Cambridge University Press (in press)
6. Peerakietkhajorn, S., Kato, Y., Kasalický, V., Matsuura, T., Watanabe, H. (2016) Betaproteobacteria Limnohabitans strains increase fecundity in the crustacean *Daphnia magna*: Symbiotic relationship between major bacterioplankton and zooplankton in freshwater ecosystem. Environmental Microbiology, 18:2366-2374
7. Mohamad Ishak N.S., Kato, Y., Matsuura T., Watanabe, H. (2016) Sequence Conservation and Sexually Dimorphic

Expression of the Ftz-F1 Gene in the Crustacean *Daphnia magna*. PLoS ONE, 11:e0154636

8. Nakanishi T., Kato, Y., Matsuura T., Watanabe H. (2016) TALEN-mediated knock-in via non-homologous end joining in the crustacean *Daphnia magna*. Scientific Reports, 6:36252

9. Ohta N., Kato, Y., Watanabe, H., Mori H., Matsuura T. (2016) In vitro membrane protein synthesis inside Sec translocon-reconstituted cell-sized liposomes. Scientific Reports, 6:364664

10. Uyeda A., Nakayama S., Kato, Y., Watanabe, H., Matsuura T. (2016) Construction of an in Vitro Gene Screening System of the *E. coli* EmrE Transporter Using Liposome Display. Analytical Chemistry, 88:12028-12035

11. Takata, R., Makado, G., Kitamura, A., Watanabe, H., Wada, T. (2016) A novel dual lock method for down-regulation of genes, in which a target mRNA is captured at 2 independent positions by linked locked nucleic acid antisense oligonucleotides. RNA Biology 13:279-289.

12. Nakanishi, T., Kato, Y., Matsuura, T., Watanabe, H. (2015) TALEN-mediated homologous recombination in *Daphnia magna*. Scientific Reports, 5:18312

13. Uyeda, A., Watanabe, T., Kato, Y., Watanabe, H., Yomo, T., Hohsaka, T., Matsuura, T. (2015) Liposome-based in vitro evolution of aminoacyl-tRNA synthetase for enhanced pyrrolysine derivative incorporation. Chembiochem, 16:1797-1802

14. Naitou, A., Kato, Y., Nakanishi, T., Matsuura, T., Watanabe, H. (2015) Heterodimeric TALENs induce targeted heritable mutations in the crustacean *Daphnia magna*. Biology OPEN, 4:364-369

15. Peerakietkhajorn, S., Tsukada, K., Kato, Y., Matsuura, T., Watanabe, H. (2015) Symbiotic bacteria contribute to increasing the population size of a freshwater crustacean, *Daphnia magna*. Environmental Microbiology Reports, 7:364-372

16. Suzuki, A., Kato, Y., Matsuura, T., Watanabe, H. (2015) Growth evaluation method by live imaging of *Daphnia magna* and its application to the estimation of an insect growth regulator. Journal of Applied Toxicology 35:68-74

17. Törner, K., Nakanishi, T., Matsuura, T., Kato, Y., Watanabe, H. (2014) Optimization of mRNA design for protein expression in the crustacean *Daphnia magna*. Molecular Genetics and Genomics, 289: 707-715

18. Soga, H., Fujii, S., Yomo, T., Kato, Y., Watanabe, H., Matsuura, T. (2014) In vitro membrane protein synthesis inside cell-sized vesicles reveals the dependency of membrane protein integration on vesicle volume. *ACS Synthetic Biology*, 3:372-379
19. Toyota, K., Kato, Y., Miyakawa, H., Yatsu, R., Mizutani, T., Ogino, Y., Miyagawa, S., Watanabe, H., Nishide, H., Uchiyama, I., Tatarazako, N., Iguchi, T. (2014) Molecular impact of juvenile hormone agonists on neonatal *Daphnia magna*. *Journal of Applied Toxicology*, 34:537-544
20. Asada, M., Kato, Y., Matsuura, T., Watanabe, H. (2014) Visualization of ecdysteroid activity using a reporter gene in the crustacean, *Daphnia*. *Marine Environmental Research*, 93:118-122
21. Asada, M., Kato, Y., Matsuura, T., Watanabe, H. (2014) Early embryonic expression of ecdysteroid-phosphate phosphatase in the water flea, *Daphnia magna*. *Journal of Insect Science* 14: 181
22. Nakanishi, T., Kato, Y., Matsuura, T., Watanabe, H. (2014) Crispr/Cas-mediated Targeted Mutagenesis in *Daphnia magna*. *PLoS ONE*, 9:e98363

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Yasuhiko Kato, Hajime Watanabe A long noncoding RNA regulates an environmental sex-determining gene doubles sex1 in *Daphnia* The 43rd Naito Conference Noncoding RNA : Biology, Chemistry, & Diseases (2017)
2. Toerner K., Kato Y., Watanabe H. TALEN を利用した非相同末端結合によるオオミジンコゲノムへのエストロゲンバイオセンサーの導入 第 2 回ゲノム編集学会 (2017)
Nur Izzatur Binti Ismail, 加藤泰彦、松浦友亮、渡邊肇 オオミジンコにおける眼の色素遺伝子 scarlet の遺伝子組み換えマーカーとしての検討 第 2 回ゲノム編集学会 (2017)
3. Y. Kato, H. Watanabe Genome editing for visualization of water pollutants using water flea The 19th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 19), (2017)
4. Arao T., Kato Y., Watanabe H. 重金属曝露を可視化したミジンコの作製 第 44 回日本毒性学会学術年会 (2017)
5. 加藤 泰彦, Nong Dang Quang, 渡邊 肇 *In vivo* レポーターアッセイによるオオミジンコの性決定遺伝子 dsx1 を制御する long noncoding RNA の作動エレメントの探索 第 19 回日本 RNA 学会年会 (2017)
6. 渡邊 肇, Syafiqah Ishak, Quang Nong, 加藤 泰彦 ゲノム編集技術によるミ

ジンコの性決定機構の解析 日本動物学会 第 88 回 富山大会 (2017)

7. 熊谷仁志、加藤泰彦、松浦友亮、渡邊肇 Use of the bicistronic expression involving viral 2A peptides in *Daphnia magna*. KAIST-OSAKA symposium (2016)
8. 中西 貴土, 荒尾 拓斗, 山口 修平, 加藤 泰彦, 渡邊 肇 「環境指標生物の毒性影響可視化のための遺伝子工学的手法の開発」 第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016)
9. 辻勇祐、加藤泰彦、渡邊肇 オオミジンコにおける組換えタンパク質の卵への輸送系の確立 第 68 回日本生物工学会 (2016)
10. Hajime Watanabe Longevity lesson from freshwater crustaceans The 5th Beneficial Microbes Conference (2016)
11. Hajime Watanabe, Quan D. Nong, Nur Syafiqah Mohamad Ishak, Yasuhiko Kato Male production mechanism in parthenogenetic crustacean, *Daphnia Magna* The 22nd International Congress of Zoology (2016)
12. Quang D. Nong, Yasuhiko Kato, Hajime Watanabe TALEN-mediated knock-in of a reporter gene for visualizing expression of the sex-determining gene dsx1 in *Daphnia magna* 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016)
13. Yasuhiko Kato, Takashi Nakanishi, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe Development of transgenic *Daphnia* for monitoring hormonal activities of chemicals 分子生物学会 BMB2015 (2015)
14. Yasuhiko Kato, Takashi Nakanishi, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe Development of transgenic *Daphnia* for monitoring hormonal activities of chemicals Pacificchem2015 (2015)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/ez/index.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
渡邊 肇 (WATANABE Hajime)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：80212322