

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：53101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14713

研究課題名（和文）バイオ医薬品生産を可能とする「スーパーミミズ」の開発～新規宿主開発への挑戦～

研究課題名（英文）Development of super earthworms that enable production of biological medicine-Challenging to develop a novel host-

研究代表者

赤澤 真一（AKAZAWA, Shin-ichi）

長岡工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：60379550

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：ミミズを活用したバイオ医薬品生産工場の開発を目指し、ミミズの一部を用いて遺伝子工学技術の開発を行ってきたが、生存率、形質転換効率が低いという課題があった。そこで、基層培地や遺伝子導入条件の最適化などを行い、生存率、形質転換効率の向上を目指した。その結果、初期条件と比較して、生存率は5.9倍、形質転換効率は1.5倍にまで向上し、完全体創生に繋がる結果を得た。

研究成果の概要（英文）：We are attempting to develop genetic engineering techniques of earthworm, *Eisenia fetida*, for producing biological medicines. Although we have succeeded to construct *E. fetida* transformation method using posterior of the earthworm, the survival rate and transformation efficiency are very low. Thus, we attempted to improve these rates. As a result, the survival rate and transformation efficiency were improved to 5.9- and 1.5-fold, respectively. These results will lead to the development of complete earthworm recombinant.

研究分野：応用生物化学

キーワード：ミミズ 形質転換法 モデル生物 バイオ医薬品 物質生産

## 1. 研究開始当初の背景

バイオ医薬品とはヒト疾患の治療を目的として遺伝子組換えにより開発されたインスリン等のタンパク質性治療薬を指し、化学系医薬品に代わり現在の主流となっている。インスリンは大腸菌で生産可能だが、エリスロポエチン（貧血治療薬）等の糖タンパク質は、大腸菌では生産出来ず、ヒトに近い糖鎖修飾が可能である動物細胞等を利用しなければならない。これがバイオ医薬品が高コストで操作が複雑となる主因となっている。そこで、生産調整も容易でコスト削減が可能である次世代型物質生産法として動植物個体を用いた「ヒューマノイドアニマル/プラント（ヒト化動物/植物）」の創出が研究されてきた[1]。しかしながら、研究の進展には遺伝子導入・発現システム等の開発及びゲノムやcDNA解析が必須である事から、宿主が限定され必ずしも最適とはいえない。従って、現在もなお最適な新規宿主探索が行われている。そこで、我々はOECD（経済協力開発機構）が毒性試験モデルとして認定しているミミズ *Eisenia fetida* に着目し、*de novo* RNA シーケンス解析により遺伝子情報を蓄積、さらに低コスト化に貢献するタンパク質分泌生産が可能である事を示し、部分的にはあるが、根幹技術であるミミズ尾部への形質転換に世界で初めて成功した（図1）[2]。しかしながら、生存率、形質転換効率共に低いという問題点があり、取扱いが容易な尾部で成功したに過ぎない。



図1. これまでに開発した手法。

## 参考文献

- 1) JST-CRDS 報告書. 戦略プログラムアグロファクトリーの創生-動植物を用いたバイオ医薬品の生産- (2007).
- 2) 赤澤真一. 形質転換ミミズの作成方法及び組み換えタンパク質の生産方法及び組み換えタンパク質の回収方法. 特願2014-212692 (2014).

## 2. 研究の目的

本研究では、現状 15%に留まる生存率と、11%に留まる形質転換効率を向上させると共に、完全体組換えミミズの創生を目的とし、1) 個体生存率の向上、2) 形質転換効率の向上、3) 新規手法による形質転換法の開発、4) 完全体組換えミミズの創生を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子導入

24時間絶食飼育させたミミズを洗浄し、尾

部から1cmのところを切断し、切断尾部を適切な基層培地上で培養後、マイクロインジェクションとエレクトロポレーションを併用し pGL4.50[luc2/CMV/Hygro] プラスミドを導入し、誘導培養後、破碎し、無細胞抽出液を調整し、ルシフェラーゼ活性をルミノメーター (GloMax-Multi+) で測定した。

### (2) 個体生存率の向上

図1における切断後及び誘導培養後の生存率が低かったため、基層培地にキムワイプ、ろ紙、砂、0.4、0.5、0.6、0.7、1.0%寒天培地を用いて切断後の頭部及び尾部を長期飼育し、生存率を検討した。飼育は20°C、湿度60%に固定した人工気象器内で実施した。生存率はルシフェラーゼ活性を測定した断片数を24時間絶食後の個体数で除したものに100をかけて算出した。

### (3) 抗生物質を併用した形質転換効率向上効果の検討

0.5%寒天に50 µg/ml アンピシリンを添加したものを基層培地とし、生存率、形質転換効率を測定した。形質転換効率はルシフェラーゼ活性が検出された個体数を遺伝子導入した個体数で除したものに100をかけて算出した。

### (4) 形質転換効率の向上を目指したエレクトロポレーション条件の検討

0.6%寒天に50 µg/ml アンピシリンを添加したものを基層培地とし、遺伝子導入時におけるエレクトロポレーションの電圧を28V、35V、42Vの3条件、パルス数を1、2、3、4、5、6 pulses/secの6条件設定し、形質転換効率を測定した。

### (5) PCRによる導入遺伝子の確認

形質転換体を液体窒素で粉碎し、ISOGENOMEを用いてゲノムを抽出した。ゲノムを鋳型として、PrimeSTAR DNA polymerase とプライマー (*luc2* 1-24bp; 5'-ATGGAAGATGCCAAAAACATTAAG-3', *luc2* 1574-1593bp; 5'-GTCCAACCTTGCCGGTCAAGTC-3')を用いて *luc2* 遺伝子の増幅をPCRで試みた。増幅された断片を電気泳動後、予想断片をSUPREC-EZで切り出し、シーケンス解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 個体生存率の向上

基層培地をキムワイプ、ろ紙、砂、0.5%寒天培地にした時の、頭部及び尾部の生存率について検討した(図2,3)。その結果、頭部、尾部共に寒天以外の基層素材では、切断から21日目で全て死滅し、寒天が適している事がわかった。次に、最適な寒天濃度を検討するために、0.4-1.0%濃度の寒天を基層として同様の実験を行った(図4,5)。その結果、0.7%以上では、頭部、尾部共に約1ヶ月で死滅する事が明らかとなった。0.4-0.6%の培地では半数以上が1ヶ月以上生存し、中でも0.6%の寒天培地が最も生存率が高く、基層素材として適している事が明らかとなった。

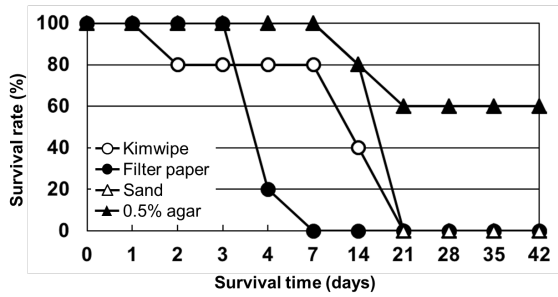


図 2 . 各基層培地における頭部の生存率 .

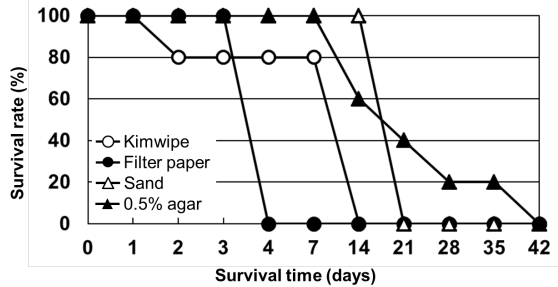


図 3 . 各基層培地における頭部の生存率 .

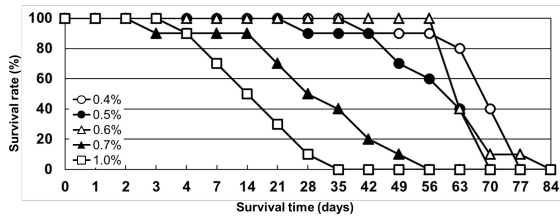


図 4 . 各基層培地における頭部の生存率 .

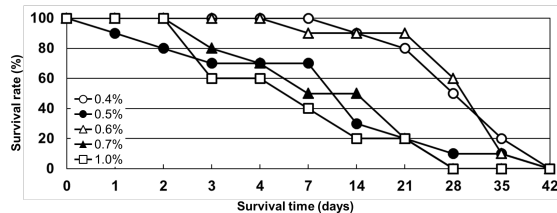


図 5 . 各基層培地における尾部の生存率 .

## (2) 抗生物質を併用した形質転換効率向上効果の検討

雑菌による組織の腐敗と培養環境の汚染を防ぐために、0.5%寒天培地に 50  $\mu\text{g/ml}$  アンピシリンを添加した培地を基層として用いた。その結果、キムワイブを基層培地として用いた初期条件と比較して、生存率は 15% から 67% に、形質転換効率は 11% から 19% に向上した。

## (3) 形質転換効率の向上を目指したエレクトロポレーション条件の検討

遺伝子導入時におけるエレクトロポレーションの電圧を 28V, 35V, 42V, パルス条件を 1~6 pulses/sec で検討したところ、最大発光強度も加味すると 35V, 3 pulses/sec が最適な条件だと考えられた。この時、生存率はさらに向上し 88% となったが、形質転換効率はやや減少し 16% となった。

以上より、最適な基層培地と最適化したエレクトロポレーション条件下で、生存率は初期条件と比較し、5.9 倍、形質転換効率は 1.5 倍に向上した。

## (4) PCR による導入遺伝子の確認

形質転換体から得られたゲノムを鋳型として PCR を行い電気泳動を行った (図 6)。目的の断片を切り出し、シーケンス解析した所、導入したプラスミドが有する *luc2* 遺伝子と一致した。従って、尾部ゲノム DNA 中に導入した遺伝子が組込まれている事が明らかとなった。

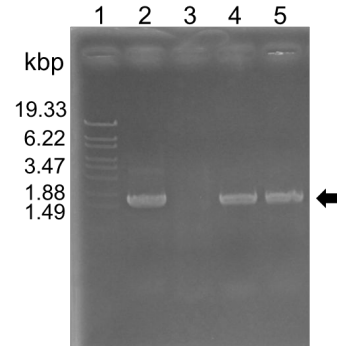


図 6 . PCR による *luc2* 遺伝子の確認 . Lane 1 ; Marker , Lane 2 ; pGL4.50[*luc2*/CMV/Hygro] vector , Lane 3 ; 遺伝子導入を行っていない *E. fetida* から抽出したゲノム DNA , Lane 4 ; 遺伝子導入を行った *E. fetida* から抽出したゲノム DNA , Lane 5 ; 遺伝子導入を行い活性があることを確認した *E. fetida* から抽出したゲノム DNA .

## (5) 新規手法による形質転換法の開発と完全体組換えミミズの創生

エレクトロポレーションを用いない全く新しい形質転換法の構築に挑戦したが、成功に至っていない。また、完全体組換えミミズ創生に向けた研究において、尾部で構築した導入法を応用し、頭部の形質転換を試みたところ、一部に導入の形跡が見られたが、断定できる結果は得られていない。頭部組換え体は遺伝子導入したルシフェラーゼの活性測定までに約 1 ヶ月程度要し、非常に時間がかかる事から、今後も更なる継続研究が必要である。

## まとめ

0.6%寒天と 50  $\mu\text{g/ml}$  アンピシリンを添加した基層培地を用い、35V, 3 pulses/sec で切断尾部を形質転換すると生存率は 88%、形質転換効率は 16% となり、初期条件と比較し、それぞれ 5.9 倍、1.5 倍にまで向上した。頭部断片への形質転換の確認には時間がかかるため今後更なる研究が必要である。

本研究で得られた成果は今後の完全体創生に向けて大きく貢献する。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

赤澤真一 . バイオ医薬品とその生産宿主 . Medical Science Digest . ニューサイエンス

社 . 42 (10) , pp. 5-8 (2016) . 査読無 .  
赤澤真一 . ミミズの魅力と可能性は無限大 .  
生物工学会誌 . 94: 576-579 (2016) . 査読無 .

〔学会発表〕(計 6 件)

Machida, Yu., Tsuchida, K., Isa, T., and Akazawa, S. Development of novel transformation method of *Eisenia fetida*. International Conference of "Science of Technology Innovation" 2017 (STI-Gigaku 2017). STI-3-114, 2017.1.6, Nagaoka University of Technology (Niigata・Nagaoka, Japan).

町田 悠, 伊佐 猛, 土田喜野, 赤澤真一 . シマミミズ *Eisenia fetida* を用いた異種遺伝子発現系の構築 . 日本生物工学会 . 2016年 9 月 28-30 . 講演番号 3P-1p022 . 富山国際会議場 (富山県・富山市) .

町田悠, 菊入祐生, 小田陽介, 赤澤真一 . バイオ医薬品生産を可能とする「スーパーミミズ」の開発 . 日本農芸化学会 . 2016年 3 月 27-30 . 講演番号 2G059 . 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市) .

小田陽介, 菊入祐生, 町田悠, 加島徳人, 若月夕佳, 村山隼人, 赤澤真一 . ミミズにおける形質転換法の開発 . ソイルエンジニアリングシンポジウム in 長岡 ~ 微生物研究・産業の未来を考える ~ . 2015年 12 月 17 . 長岡グランドホテル (新潟県・長岡市) .  
Akazawa, S., Machida, Y., Okawa, H., Watanabe, T., and Wakimoto, S. Development of novel earthworm powder and investigation of its therapeutic effects in animals. The 6th Federation of Asian Small Animal Veterinary Associations Congress (FASAVA). 2015.11, Taipei (Taiwan).

赤澤真一, 町田悠, 加島徳人, 若月夕佳, 村山隼人 . 遺伝子組換えタンパク質を生産可能とする「スーパーミミズ」の開発 . 日本生物工学会 . 2015年 10 月 26-28 . 講演番号 1P-028 . 要旨集 p. 95 . 城山観光ホテル (鹿児島県・鹿児島市) .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

招待講演

"未来へのバイオ技術" 勉強会 驚異の動物イノベーション . 演題 : ミミズが医薬品生産工場になる? ~ 新規宿主開発への挑戦 ~ . 主催 : (一財) バイオインダストリー協会 . 協力・協賛 : (公社) 日本生物工学会, (公社) 日本農芸化学会, PO 法人日本分子生物学会 . 2016年 7 月 4 日 . 会場 : (一財) バイオインダストリー協会会議室 (東京都・中央区) .

The 6th Federation of Asian Small Animal Veterinary Associations Congress (FASAVA). Title: An overview of earthworm functional enzymes: digestive and fibrinolytic enzymes. Federation of Asian Small Animal Veterinary Associations (FASAVA). 2015.11.21. Taipei (Taiwan).

展示会出展

赤澤真一 . ミミズで解決! -人の健康&環境問題-. イノベーション・ジャパン-大学見本市 (出展) . 主催 : 国立研究開発法人科学技術振興機構, 国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 . 共催 : 文部科学省, 経済産業省 . 2016年 8 月 25-26 日 . 会場 : 東京ビッグサイト (東京国際展示場) (東京・江東区) .

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

赤澤 真一 (AKAZAWA Shin-ichi)  
長岡工業高等専門学校・物質工学科・准教授  
研究者番号 : 60379550

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし