

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03864

研究課題名(和文) 遺伝子組換えアマゴをモデルにしたオミクス解析に基づくシグナル伝達で計る安全性評価

研究課題名(英文) Omics analysis based on signal transduction using GH transgenic Amago salmon

研究代表者

森 司 (MORI, Tsukasa)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60241379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：1匹の雌から得たホモ接合体およびヘミ接合体のGH遺伝子組換えアマゴは低血糖を起こした。iTRAQを用いたプロテオーム解析およびシグナルネットワーク解析により、遺伝子組換え魚ではNAD<sup>+</sup>/NADH比が低下しており、ミトコンドリアND1機能の低下と活性酸素レベルの低下が示唆された。ミトコンドリアDNA配列解析の結果、GHホモ接合体およびヘミ接合体メス由来のミトコンドリアDNAの欠失変異の約28%がND1に生じた。これらの魚は活性酸素レベルの減少を示した。この結果は、アマゴのGH遺伝子導入が、世代を超えて母方から遺伝する特定の欠失変異を誘発し、エネルギー産生を変化させる可能性があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子組換え技術により多くの生物の品種改良がなされている。この遺伝子組換えは基本的にはゲノムに有用な遺伝子を導入することで生物の形質に組換えられた遺伝子の形質を加える事を目的とするものである。しかし、今までの研究で遺伝子組換えにより、目的以外の、その他の形質にも変化が起きることが明らかになった。例えば肝臓の形態形成異常や心臓の巨大化、その他にも組換え魚の種類にもよるが血糖値の低下などである。これらは何故起きるのかは謎である。しかし、この実験では遺伝子組換えがゲノムだけではなく、ミトコンドリアDNAにまで影響を与える可能性を示唆した。その為、遺伝子組換えはまだ基礎研究として続ける必要がある。

研究成果の概要(英文)：Growth hormone (GH) transgenesis can be used to manipulate the growth performance of fish and mammals. In this study, homozygous and hemizygous GH-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*) derived from a single female exhibited hypoglycemia. Proteomic and signal network analyses using iTRAQ indicated a decreased NAD<sup>+</sup>/NADH ratio in transgenic fish, indicative of reduced mitochondrial ND1 function and ROS levels. Mitochondrial DNA sequencing revealed that approximately 28% of the deletion mutations in the GH homozygous- and hemizygous-female-derived mitochondrial DNA occurred in ND1. These fish also displayed decreased ROS levels. Our results indicate that GH transgenesis in amago salmon may induce specific deletion mutations that are maternally inherited over generations and alter energy production.

研究分野：生理生化学

キーワード：GH 遺伝子組換え アマゴ ミトコンドリア ND1

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子操作技術は、農業、養殖業、園芸業、医学など様々な分野で一般的に利用されている。成長ホルモン (GH) は、糖質・脂質・窒素・ミネラルの代謝、細胞分化、免疫系の維持、心機能、情動・ストレス反応・行動の抑制に関わることから、動物の成長促進に利用されてきた。GH 遺伝子操作技術は、コイ、ティラピア、ドジョウ、マダイ、ゼブラフィッシュ、ギンザケ、ニジマス、アトランティックサーモンなどの養殖研究において広く採用されている。特に、GH 遺伝子導入サケは、非遺伝子組換えサケの 6 倍から 40 倍の成長速度を示すことが報告されている。2015 年、食品医薬品局は、成長能力を強化した組換えサケを人間の食用に承認し、これらの魚の商業化に繋げた。また、GH 遺伝子組換えアトランティックサーモンは、野生型魚と比較して、鰓の表面積の増加、腸絨毛の発達、食物変換効率の向上、摂取した食物中の脂質の利用などの特徴ある表現型特性を示した。一方、GH 過剰発現の影響として、先端巨大症、心肥大、生殖能力の低下などが考えられる。しかし、GH 過剰発現の影響は系統や種によって異なり、一貫して観察される訳では無い。以前の研究では、GH 遺伝子組換えサーモンにおいて、下垂体は多様な環境条件に適応するための他のホルモンに加えて、GH を産生する為 GH のネガティブフィードバックに起因する下垂体の縮小が観察された。

今までの研究において、私達は、1 匹の雌の GH 遺伝子導入魚の卵にサケ GH の遺伝子を注入し、GH 遺伝子導入アマゴ (*Oncorhynchus masou ishikawae*) 系統を樹立することに成功した。この魚に導入した外来 GH 遺伝子は OnMTGH1 (*Oncorhynchus masou* GH1 gene fused to metallothionein-B) を用いており、この遺伝子を導入した GH 遺伝子組換えアマゴでは脂質代謝に関係する 6-desaturase やアポリポプロテイン、免疫に関係するペントラキシンや血清リゾチーム活性が低下した。これらの GH 遺伝子組換えアマゴは、野生型魚と比較して、肝臓組織の形態変化、血漿 GH1 およびインスリン様成長因子 1 の濃度が有意に上昇し、総コレステロールおよびトリグリセリドレベルが低下した。さらに、ホモ接合体 (雌雄両方から由来の外来 GH 遺伝子を持つ魚で、卵子/精子の外来 GH を Tg/Tg と示す) 及びヘミ接合体 GH 魚 (雌魚由来の外来 GH、Tg/+) は血清グルコース値の低下、GRP78 (グルコース飢餓遺伝子) の発現上昇、ケトン体 (3-ヒドロキシブチル酸) レベルの増加、飽和脂肪酸レベルの低下 (14:0) および一価不飽和脂肪酸 (16:1n-7, 18:1n-9) の肝臓と筋肉組織での減少が確認された。

しかし、一体なぜ、このような現象が起きるのだろうか? GH 遺伝子組換えアマゴで観察されるこのような生理的表現型の変化が、導入された遺伝子によるゲノム変異にのみ起因するのか、その他の遺伝子を持つミトコンドリアにまで影響を与えて、ミトコンドリアの機能にまで変化を与えるのかは不明である。一般に、遺伝子導入は宿主の核ゲノムにある遺伝子の発現にのみ影響を与えると考えられている。しかし、GH 遺伝子組換えアマゴでは、外来遺伝子のゲノム挿入に由来する異常の証拠はなく、この点に関する研究は、遺伝子組換えの安全性評価において極めて重要であると考えられる。そこで、まず、外来 GH 遺伝子が雄に由来するヘミ接合体魚と雌に由来するヘミ接合体魚の生理的差異について検討した。その結果、(雌由来:Tg/+)と(雄由来:+/Tg)の間で血清グルコース濃度に違いがあり、そのパターンは後続世代でも再現された。これらの結果は、GH 遺伝子導入アマゴの母系遺伝を示すミトコンドリア DNA (mtDNA) との関連を示唆するものである。そこで、GH 遺伝子導入魚のこれらの表現型にミトコンドリアの機能不全が寄与しているかどうかを検討し、これまでの GH 遺伝子組換えアマゴの生理状態との関連を調べることを本研究の目的とした。

## 2. 研究の目的

成長ホルモン(GH)の遺伝子導入は、魚類や哺乳類の成長促進のために利用できる。本研究では、外来 GH が導入された 1 匹の雌から得たホモ接合体および雌由来ヘミ接合体の GH 遺伝子組換えアマゴが世代を超えて低血糖を起こした。その為、肝臓からタンパク質を抽出し iTRAQ を用いてプロテオーム解析およびシグナル伝達のネットワーク解析により、この GH 遺伝子組換えアマゴでは NAD<sup>+</sup>/NADH 比が低下しており、ミトコンドリア ND1 機能の低下と活性酸素レベルの低下が示唆された。その為、これらの生理的現象が起きる理由を分子のレベルから明らかにする事を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### 血糖値の測定と d-ROM テスト

20 ゲージ針で行われた採血は 9,200 × g で 10 分間遠心分離した後、直ちに液体窒素で凍結した。血清中のグルコース濃度は Fuji Dry Chem 3030 を用いて測定した。

### iTRAQ によるプロテオーム解析

解剖後、(Tg/Tg) および (+/+) 魚の肝組織を取り出し、直ちに液体窒素に入れた。(+/+) と (Tg/Tg) の肝組織からタンパク質を抽出し (114:116 = +/+; 115:117 = Tg/Tg)、その後、iTRAQ reagent 4 plex (AB Sciex, Redwood City, CA, USA) で標識した。

### NAD<sup>+</sup>/NADH の LC-MS 分析と Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 解析

4 種類の魚 (Tg/Tg, Tg/+, +/Tg, +/+) から得た凍結肝組織 (n = 3) を 2.0 mL 微量遠心管で秤量 (15 mg) し、プーリングせずに分析した。

### ウェスタンブロットティング

iTRAQ に基づくプロテオミクスデータは、ウェスタンブロットティングを用いて確認した。実験では化学発光により目的のタンパク質を可視化した。

### 肝組織の CE-TOF-MS 分析

5 匹の GH ホモ接合体およびヘミ接合体魚と非トランスジェニック兄弟魚の肝臓組織を切り出し、ホモジナイズし、CE-TOF-MS 分析用に 1 つのサンプルとしてプールして、CE-MS 分析を行った。

### 免疫蛍光法

凍結肝組織を CM 1950 クライオスタットを用いて 10 $\mu$ m 切片にし、固定、洗浄し、ブロッキングした。切片は抗 ATP5a とともに DAPI を滴下して、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。画像解析ソフトで細胞あたりの総ミトコンドリア面積を算出した。

### 透過型電子顕微鏡(TEM)観察

薄切片分析には、3 種類の GH ホモ接合体魚と非トランスジェニック兄弟魚が用いられた。試料はエポキシ樹脂に包埋し、超ミクロトームを用いて埋込試料を切片化し、超薄切片を作製した。この切片を TEM (JEM-1200EX) で観察した。

### ミトコンドリアゲノム解析、ゲノムアセンブリ、バリエーション解析、SNP のバリデーション、欠失変異の解析

ミトコンドリア遺伝子解析は、2 種類の (+/+) と (Tg/Tg) 魚を使って別々に行われた。変異解析には、SolexaQA v3.1.7.1、BWA v0.7.15、Picard v1.119、GATK v3.8.0。ND1 の Mini seq は BWA v0.7.17、GATK v4.0.1.0 and v4.0.5.0 を使用。

### イルミナ解析のための RNA 抽出

(Tg/Tg) 群から 1 匹を RNA-seq に使用した。RNeasy Mini Kit を用いて、肝臓組織から RNA を抽出した。RNA は Bio photometer を用いて定量され、Illumina 解析に使用した。RNA seq を用いた変異解析には、AfterQC v0.9.6 と Hisat2 v2.1.0 を使用した。

## 4. 研究成果

## GH 遺伝子組換え魚の作製

サケの導入用外来 GH 遺伝子である OnMTGH1 を約 5000 個の卵に注入し、生殖細胞に OnMTGH1 が異所的に組み込まれたモザイク魚 13 尾と雌 1 尾を得た。この 1 匹の雌魚 (Tg/+) を用いて GH 遺伝子組換えアマゴ系統を作製し、GH 遺伝子組換え雌魚 (Tg/+) と野生型雄魚 (+/+) を受精させて F1 GH 遺伝子組換え魚 (Tg/+) と (+/+) を作出した。その後、OnMTGH1 シークエンスプライマーを用いた PCR により、F1 魚を選別した。選択された遺伝子組換え F1 魚 (Tg/+) を互いに受精させ、(Tg/Tg) を生成した。選抜された (Tg/Tg) 魚は、野生卵と野生精子と受精させ、それぞれ (Tg/+) と (+/Tg) を作製した。

ホモ接合体 GH 遺伝子組換えサーモンを ( / ; Tg/Tg) 異所性 GH が雌由来のヘミ接合体 GH 遺伝子組換えサーモンを ( / ; Tg/+) 異所性 GH が雄由来の遺伝子組換え魚を ( / ; +/Tg) と表記する。また、GH を持たない兄弟魚を (+/+) と表記した。GH 遺伝子導入魚の肝臓組織には、世代を経るごとに異常な形態形成が認められ、(Tg/Tg)、(Tg/+)、(+/Tg) 魚では不規則で複雑な形状を呈していることが確認された。血中グルコース濃度は、(+/+) と (+/Tg) 魚の間で変化がなかった ( $p = 0.05$ )。しかし、(Tg/Tg) および (Tg/+) 魚の血糖値は、F2 および F5 世代を通じて (+/+) 魚の血糖値より有意に低かった。

## iTRAQ によるプロテオミクス

解糖と ATP 産生に関連する代謝経路を特定するために、プロテオミクス解析を行った。この解析で、(Tg/Tg) 魚は血清グルコース値が低く、肝臓の形態異常が見られたため、(Tg/Tg) と (+/+) の肝臓組織が使用された。同定された 292 個のタンパク質のうち、270 個は (Tg/Tg) 魚で (+/+) 魚に比べ 1.5 倍以上の発現増加を示した。これらの発現上昇タンパク質は、解糖、トリカルボン酸 (TCA) サイクル、嫌気性代謝、電子輸送鎖に関与していた。これらのデータを確認するために、ウエスタンブロッティングを行った。(Tg/Tg) 魚のフルクトースビスリン酸アルドラーゼ A、シトクロム C、ATP 合成酵素 (ATP5a) レベルは、(+/+) 魚に比べて有意に高かった。

## iTRAQ データを用いた Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 解析

GH 遺伝子導入により影響を受けるシグナル伝達カスケードを同定するため、シグナル伝達ネットワークを解析した。本研究で同定されたタンパク質のアミノ酸配列を、UniProt データベースで利用可能なタンパク質のアミノ酸配列とアラインメントし、IPA により、ミトコンドリア機能不全が変化した代謝経路上位 5 つに含まれていることがわかった。さらに、疾患・障害、生理系の発生と機能、分子・細胞機能が上位 5 経路に含まれた。疾患・障害では、がん、生体損傷、神経疾患に関連するタンパク質が GH ホモ接合体魚で発現していた。また、生理的発生カテゴリーでは、心血管系成分や臓器発生など、細胞の肥大化に関わるタンパク質も発現していた。

## 肝組織の透過型電子顕微鏡 (TEM) による ATP 濃度の測定とミトコンドリアの形態解析

(Tg/Tg) および (Tg/+) 魚の ATP 濃度は、(+/+) 魚の半分以下にまで減少した。iTRAQ の結果、(Tg/Tg) 魚の OPA1 (OPA1; ダイナミン様 120kDa タンパク質、ミトコンドリア) レベルは (+/+) 魚に比べて 1.9 倍増加した。OPA1 の量から ATP 合成の亢進が予測されたが、我々のデータはこれに反していた。蛍光標識した抗 ATP5a 抗体を用いてミトコンドリアの数と形態を測定したところ、(Tg/Tg) 魚では細胞あたりのミトコンドリア数が有意に ( $p < 0.05$ ) 増加していることが確認された。次に、TEM を用いて遺伝子組換え魚のミトコンドリア形態を調べた。(Tg/Tg) 魚と (+/+) 魚の間で、ミトコンドリアの面積と形状に有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められた。GH 遺伝子組換え魚の全体的な生理学的条件と表現型の予測を行うと、NAD<sup>+</sup> から TCA サイクルを経て NADH が生成され、ミトコンドリア内で複合体 1 により NAD<sup>+</sup> に変換される。したがって、複合体 1 は NAD<sup>+</sup>/NADH の比率に関して恒常的な役割を担っている。その為、(Tg/Tg) および (Tg/+) 魚の NAD<sup>+</sup>/NADH 比

は、(+/+) および (+/Tg) 魚のそれよりも有意に低かった ( $p < 0.05$ )。さらに、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 コアクチベーター-1 (PGC-1) \ OPA1、NAD<sup>+</sup>の関係が IPA によって予測された。血清グルコース濃度が低い場合、低 ATP 濃度を補うためにグルコネシン生成と TCA サイクルが促進される。しかし、ND1 (NADH-コピキノン酸化還元酵素鎖 1) 部位の機能障害は、NADH から NAD<sup>+</sup>への変換が減少し NAD<sup>+</sup>/NADH 濃度が低くなってしまふ。その結果、ATP の産生が減少し、さらに TCA サイクルが活性化されて ATP が産生の為に TCA サイクルの更新が予測された。ウェスタンブロットティングの結果、(Tg/Tg) 魚では PGC-1 の発現が対照魚よりも有意に高かった ( $p < 0.05$ )、OPA1 のウェスタンブロットティングでは、5 つの主要なタンパク質シグナルが検出され、総シグナル強度は (Tg/Tg) 魚で (+/+) 魚のそれよりも有意に高かった ( $p < 0.01$ )。

#### mtDNA および RNA の発現解析

NAD<sup>+</sup>/NADH 比の低下は、ミトコンドリアにおける ND1 の機能不全を反映していると考えられる。mtDNA の塩基配列の決定とアライメントは、*O. masou ishikawae* のゲノム配列 (NC\_008746) をもとに行った。(+/+) と (Tg/Tg) を用いて 150 bp paired-end run を行い、それぞれ 12,114,092 と 15,034,882 のリードを取得した。したがって、ミトコンドリア (16,652bp) に対する配列のカバー率は、それぞれ 218,246 および 270,866 倍であった。

Genome Analysis Toolkit を用いた変異解析の結果、4 種類の変異があることが判明した。「GC to G」「C to T」変異は非遺伝子組換え魚 (+/+) で検出され、「C to CT」「TAC to T」変異は (Tg/Tg) 魚で検出された。しかし、(Tg/Tg) 魚が最も顕著な形態異常と代謝異常を示したため、(Tg/Tg) 魚に絞って解析を行った。これらの変異を持つ対応遺伝子を調べたところ、ND1 において「TAC to T」が検出された。次に、4,141bp の mtDNA 配列を詳細に調べたところ、4142 位の「A」の欠失は 292,718 (総数) 配列中 44,346 (欠失数)、4143 位の「C」の欠失は 293,437 (総数) 配列中 44,329 (欠失数) に発生することが確認された。これらのデータから重複する配列を除外したところ、「A」「C」の欠失は、総数 480、468 配列 (欠失のない塩基) のうち、それぞれ 135、133 配列に存在した。これらのデータは mtDNA の 22% に欠失変異が存在することを示す。

#### ジアクロン-活性酸素代謝物 (d-ROM) 試験による酸化ストレスの測定

活性酸素種 (ROS) -酸化化合物の総量を d-ROM 試験で測定した。(Tg/Tg) および (Tg/+) 魚に由来する総 ROS 量は、(+/+) および (+/Tg) 魚に由来する ROS 量よりも有意に少なかった。この結果は、PGC-1 の発現上昇に基づく IPA の予想と一致した。また、(+/+) 魚と (+/Tg) 魚の間で活性酸素量に有意な差は見られなかった。

#### mtDNA の欠失変異部位と抗酸化防御システム

(Tg/Tg) の欠失変異部位をヒトのものを基準として Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 検索を行った。その結果、アミノ酸残基 "Thr" はヒト ND1 の 96 番目の位置の Val に対応することがわかった。その後、ヒトミトコンドリアゲノム SNP データベースを用いて、96 番目のアミノ酸残基に対応する mtDNA の塩基部位を検索した。GH 遺伝子導入アマゴで観察された欠失変異 (4,142~4,143bp) は、ヒト ND1 の 3,593~3,594bp と一致した。

遺伝子発現を過去のデータに基づいて再解析したところ、NADPH 酸化酵素の構成要素である好中球細胞質因子 1 (NCF1)、チトクローム b-245 鎖 (CYBB)、Rac family small GTPase 1 (RAC1)、RAC2 の発現が (+/+) と比較して低下していることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomohiko Sato, Naoko Goto Inoue, Masaya Kimishima, JikeToyoharu, Ryuhei Minei, Atsushi Ogura, Hiroyuki Nagoya & Tsukasa Mori	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 A novel ND1 mitochondrial DNA mutation is maternally inherited in growth hormone transgenesis in amago salmon ( <i>Oncorhynchus masou ishikawae</i> )	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10521-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤友彦、井上菜穂子、地家豊治、逸見明博、名古屋博之、森 司
2. 発表標題 ミトコンドリアの機能から解析した成長ホルモン(GH)遺伝子組換えアマゴのエネルギー代謝変化
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 司
2. 発表標題 成長ホルモン(GH)遺伝子組換えアマゴに見られる特異的表現系
3. 学会等名 金沢大学環日セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井上 菜穂子  (INOUE Naoko)  (00509515)	日本大学・生物資源科学部・准教授    (32665)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	関 泰一郎  (SEKI Taiichiro)  (20187834)	日本大学・生物資源科学部・教授     (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関