

令和 2 年 9 月 7 日現在

機関番号：53101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07767

研究課題名（和文）ミミズを活用したバイオ医薬品生産～ミミズ形質転換技術の開発～

研究課題名（英文）Biomedicine production using earthworms-Development of earthworm transformation system-

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） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：全く新しいバイオ医薬品生産宿主開発として、ミミズを用いた宿主開発を実施した。これまで我々が開発した遺伝子組み換え技術は形質転換効率が低かったが、最大48%にまで向上させることに成功した。また、微量ながら腎性貧血治療薬ヒトエリスロポエチンの生産に成功した。本成果により、ミミズを用いた物質生産系の実現可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在バイオ医薬品は動物細胞を主として生産されているが、操作性やコスト面が課題となっている。そこで、次世代型の生産法として動物/植物個体を宿主として生産するヒューマノイドアニマル/プラントが研究されている。その一環としてミミズによるバイオ医薬品の生産を目指し、宿主開発を行ってきた。その結果、ヒトタンパク質の生産に微量ながら成功した事は、全く新しい宿主の誕生を意味し、開発された遺伝子組換え技術は様々な分野へ波及することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The research presented here aimed to develop the earthworms *Eisenia fetida* Waki and *E. andrei* Sagami as next-generation animal protein production hosts. Although the transformation rate of our previously developed method was low, we have succeeded to improve the rate up to 48%. In addition, human erythropoietin was detected in transformed earthworm tail fragments by ELISA. These results might contribute to the development of a novel earthworms-based animal protein production system.

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 *Eisenia*

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 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、糖鎖修飾が可能で、低コスト化に貢献するタンパク質分泌生産も可能なミミズに着目し、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た。微生物よりも高等で、高等動物よりも扱いやすい新規物質生産宿主の提供を目指した研究開発である。近年は実験動物の使用を禁止・削減する動きがあるがミミズはその対象ではない。さらに開発モデルとしたシママミズ *Eisenia fetida* 及び *Eisenia andrei* は、経済協力開発機構(OECD)が土壌毒性試験のモデル生物として認定しているため、世界で最も研究が盛んなミミズであり、成果は世界中に波及する。しかしながら、形質転換技術等遺伝子工学技術が無かったため、これまで我々は形質転換技術等を開発してきた[2]。その結果、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が、生存率(88%)は大きく向上したが、形質転換効率(16%)が未だ低く、頭部断片への導入や、恒常的発現系の構築にいたっておらず、ヒト遺伝子の発現にも成功していない。

[1] 科学技術振興機構研究開発戦略センター。戦略プログラムアグロファクトリーの創成-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。特許 6448294 号 (2018)。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究の進展に必須となるゲノム・cDNA 情報の蓄積、未だ低い形質転換効率の向上、卵を活用した恒常的発現系の構築のための卵培養法の検討及びヒトタンパク質生産法の構築を行い、ミミズがヒトタンパク質生産可能かどうか明らかにする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ゲノム・cDNA 情報の解析及び高発現推定プロモーター領域のクローニング

研究で使用するミミズ (*E. fetida* Waki 及び *E. andrei* Sagami) は世界中で様々な研究(バイオマス資化、重金属吸着等)に活用されているが、遺伝子情報がほとんどなく、研究進展の妨げとなっていた。そこで、*de novo* RNA シーケンスデータベースを構築したが(科研費萌芽研究 H27-H28)、ゲノムは解析していなかった。そこで、今後の研究の進展に必須となるゲノムを株式会社メイズに委託し解析した。また、本データベースを元に高発現推定プロモーター領域のクローニングを行った。

#### (2) 形質転換効率の向上

*E. fetida* 尾部を用いて、遺伝子導入時間、エレクトロポレーション条件、遺伝子導入に用いる電極の直径(1 mm, 7 mm)、遺伝子導入器具(100 µm マイクロシリンドリ及び 10 µm ガラスキャピラリー)の違いによる生存率、形質転換効を検討した。導入遺伝子は pGL4.50[luc2/CMV/Hygro] (Promega) を用いて、ルシフェラーゼアッセイにより形質転換の有無を判定した。また、構築した手法を *E. andrei* に適応し、生存率、形質転換効率を測定した。

#### (3) 頭部への遺伝子導入による一過性発現系の構築

尾部への遺伝子導入と導入遺伝子の検出は成功しているが、頭部では未だ成功していない。そこで、頭部再生断片へ pGL4.50[luc2/CMV/Hygro] プラスミドを導入し、ルシフェラーゼ活性をルミノメーター(GloMax -Multi+) で測定し、導入遺伝子を PCR で検出した。PCR に用いる鋳型ゲノムは、形質転換体を液体窒素で粉碎し、ISOGENOME(ニッポンジーン)を用いて鋳型ゲノムを調製した。PCR はゲノムを鋳型として、PrimeSTAR DNA polymerase とプライマー(luc2 1-24bp; 5'- ATGGAAGATGCCAAAACATTAAG-3', luc2 1574-1593bp; 5'-GTCCAACCTTGCCGGTCAGT C-3')を用いて luc2 遺伝子の増幅を行った。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) 卵培養法の確立

ミミズは卵が数個入った卵胞を産み落とす。これまでに、遺伝子導入に必要な真の卵を取り出す事には成功しているが、湿らせたキムワイプや脱脂綿上では孵化しなかった。そこで、取り出した卵支持基盤に寒天、砂を用いて、細胞培養に用いられる基礎培地やバッファーを添加する事で孵化条件を検討した。

#### (5) ヒト由来遺伝子の発現とタンパク質生産

大腸菌では生産困難である腎性貧血治療薬であるエリスロポエチン(hEPO)の生産を試みた。hEPO 発現ベクター pRC210775[hEPO/CMV] (Origene Technologies Inc. Rockville, MD, USA) を *E. andrei* 尾部断片にガラスキャピラリーとエレクトロポレーションにより導入した。72 時

間培養後、EPO ELISA キット (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) で hEPO タンパク質の検出を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ゲノム・cDNA 情報の解析及び高発現推定プロモーター領域のクローニング

解析したデータベースより、発現量が高い遺伝子 10 個を見出し、その内、上流域が比較的長い推定プロモーター候補領域を 4 つ選出した。その内、3 つのクローニングを終了し、今後プロモーターアッセイを行う。

##### (2) 形質転換効率の向上

形質転換法のスキーム及び検討した条件を図 1 に示した。最適遺伝子導入時間及びエレクトロポレーション条件を検討したところ、切断後 24 h 経過した断片を用いて、35 V, 3 pulses/sec, duration 60 msec, interval 1.0 sec の条件下で、生存率 88%, 形質転換効率 16% と最も高くなった。次に同条件で *E. andrei* に導入したところ、生存率 60%, 形質転換効率 12% となった。

次に、電極の直径を 1 mm から 7 mm に変更したところ、生存率 48%, 形質転換効率 32% となった。最後に遺伝子導入に用いるシリンジの直径を検討したところ、10  $\mu$ m ガラスキャピラリーを用いたところ、*E. fetida* と *E. andrei* の生存率は 78% と 92%, 各形質転換効率は、28% と 48% となった。

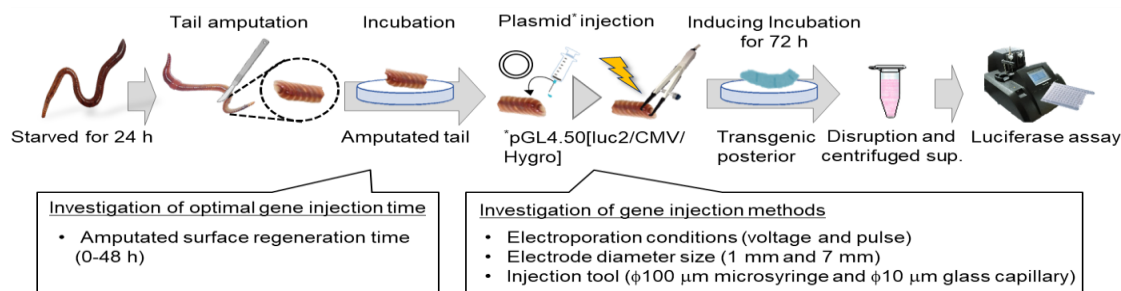


図1. 尾部を用いた形質転換法のスキーム及び検討した条件。

##### (3) 頭部への導入による一過性発現系の構築

*E. andrei* 頭部断片への遺伝子導入においては、生存率 100%, 形質転換効率 20% となり、PCR (図 2) 及びシーケンス解析により遺伝子が導入された事を確認した。

##### (4) 卵培養法の確立

卵胞の状態では砂培地において孵化させることに成功したが、卵胞を取り除いた状態では、寒天、砂培地いずれにおいても孵化させることが出来ず、現在も条件を検討している。

##### (5) ヒト由来遺伝子の発現とタンパク質生産

ヒトエリスロポエチン (hEPO) 発現ベクター pRC210775[hEPO/CMV] を *E. andrei* 尾部断片にガラスキャピラリーとエレクトロポレーションにより導入し、ELISA により hEPO の検出に成功した。活性については今後マウス等で検討していく。

本研究により、ミミズ尾部及び頭部断片を用いた一過性発現系を構築し、ヒトタンパク質の生産に成功した。これにより、ミミズによるバイオ医薬品生産の可能性が示された。本成果の一部は現在 Sci. Rep. に投稿中である。

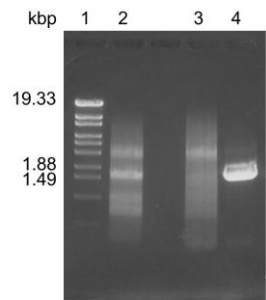


図2. *E. andrei* 頭部形質転換断片からの luc2 遺伝子の PCR による増幅。Lanes 1, OneSTEP Marker 6 ( $\lambda$ /Sty I digest) (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo, Japan); lanes 2, amplified luc2 fragment from pGL4.50[luc2/CMV/Hygro]; lanes 3, amplified luc2 fragment from genomic DNA; lane 4, amplified luc2 fragment from transformed anterior fragment.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 赤澤真一	4. 巻 2(11)
2. 論文標題 古くて新しいミミズ研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 62-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 赤澤真一
2. 発表標題 ミミズで解決！人の健康・食糧問題～ミミズの多様な機能性～
3. 学会等名 第11回北陸合同バイオシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山谷竜大，神田直輝，竹内綾，町田悠，赤澤真一．
2. 発表標題 環境バイオセンサーや新規宿主としての開発を目指したミミズの形質転換系開発
3. 学会等名 第11回北陸合同バイオシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamaya, T., Kanda, N., Takeuchi, A., Machida, Y., and Akazawa, S.
2. 発表標題 Development of earthworm transformation system for novel research tools.
3. 学会等名 3rd International Conference of “Science of Technology Innovation” 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山谷竜大, 赤澤真一.
2. 発表標題 ミミズを用いた重金属汚染センサの開発を目指したミミズ形質転換系の開発
3. 学会等名 第59回新潟生化学懇話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akazawa, S., Ikarashi, Y., Yokoyama, K., Shida, Y., and Ogasawara, W.
2. 発表標題 Characterization of earthworm alpha-amylases for development of dietary supplement and biomass utilization.
3. 学会等名 1st International Earthworm Congress (IEC 1). (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山谷竜大, 竹内 綾, 町田 悠, 土田喜野, 赤澤真一.
2. 発表標題 ミミズEisenia fetidaで構築した遺伝子導入法の応用可能性の検討及びミミズによるバイオ医薬品生産の試み
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeuchi, A., Yamaya, T., Machida, Y., Tsuchida, K., Isa, T., and Akazawa, S.
2. 発表標題 Investigation of optimal heterologous gene transfer system of earthworm
3. 学会等名 2nd International Conference of "Science of Technology Innovation" 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山谷 竜大, 町田 悠, 土田喜野, 竹内 綾, 伊佐 猛, 赤澤真一
2. 発表標題 ミミズにおける最適な異種遺伝子導入法の検討
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 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	発明者 赤澤真一	権利者 独立行政法人国立高等専門学校機構
産業財産権の種類、番号 特許、特許6448294号	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

<p>微生物化学研究室ホームページ  <a href="http://material.nagaoka-ct.ac.jp/staff/shin-ichi-akazawa">http://material.nagaoka-ct.ac.jp/staff/shin-ichi-akazawa</a>          長岡工業高等専門学校 物質工学科 微生物化学研究室ホームページ  <a href="http://material.nagaoka-ct.ac.jp/staff/shin-ichi-akazawa">http://material.nagaoka-ct.ac.jp/staff/shin-ichi-akazawa</a></p>
--

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