

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19282

研究課題名(和文)アコヤガイ外套膜上皮細胞のゲノム改変による新規バイオミネラル作成技術の開発

研究課題名(英文) Development of novel biomineral formation technology by genome modification of mantle outer epithelial cells in pearl oyster

研究代表者

木下 滋晴(Kinoshita, Shigeharu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：40401179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な真珠貝として知られるアコヤガイについて、真珠形成を行う細胞である外套膜上面上皮細胞のゲノムを人為的に改変する手法の確立を試みた。外套膜組織片やそこから分離した上面上皮細胞に対し、アコヤガイと異なる生物の遺伝子を導入をした結果、そうした外来遺伝子がアコヤガイの一部の細胞で発現することを確認した。また、任意の遺伝子に変異を誘導するゲノム編集技術であるCRISPR/Casを使い、アコヤガイのゲノム編集を試みた。これについては、ある一つの遺伝子について変異の導入を検出したが、検出過程でのエラーの可能性を排除できないため、さらに検証する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養殖真珠産生にも散られるアコヤガイは、産業上重要種であるが、バイオミネラル研究のモデルとしても長い歴史を持つ。本研究では、アコヤガイを対象に、遺伝子導入やゲノム編集によるゲノム改変を真珠形成組織である外套膜細胞に施し、一定の成果を得た。アコヤガイの真珠形成関連遺伝子は数多く見つかっているが、それらの機能は不明なものが多く、アコヤガイにおける遺伝子導入や改変技術は、そうした遺伝子の機能解析を行うための技術基盤として重要である。また、遺伝子改変を行った外套膜細胞を用いて、アコヤガイをバイオリクターとした新規バイオミネラル作出技術の確立にもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined to establish a method of artificial genome modification of the mantle outer epithelial cells. Mantle outer epithelial cells are responsible for the pearl formation. As a result of introducing genes of organisms different from those of the pearl oyster into the mantle tissue fragment and the outer epithelial cells isolated, expression of exogenous genes were detected in cells of the pearl oyster. We also tried genome editing of pearl oysters using CRISPR/Cas, a genome editing technology that induces mutations in any gene. Regarding this, although the introduction of a mutation was detected for a certain gene, the possibility of an error in the detection process can not be excluded, it needs further verification.

研究分野：水圏生物学

キーワード：アコヤガイ 真珠 ゲノム編集 遺伝子導入 バイオミネラル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオミネラルは生物が作る鉱物で、有機物と無機物がハイブリッドを形成することで、人工的には作れないような複雑な構造や特殊な物性を持つ。医療分野や工学分野における機能性材料の開発等、様々な方面で注目される生体鉱物である。なかでもアコヤガイの作る真珠は、宝飾品としての価値も高いことから、バイオミネラリゼーション研究の対象として歴史が長い。真珠の美しい輝きは、炭酸カルシウム結晶と有機質が交互に積層した独特の構造に依る(図1)。

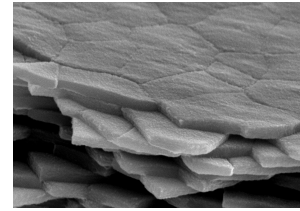


図1. 真珠断面の電顕写真

こうした構造は、アコヤガイの外套膜上皮細胞から分泌される様々な真珠形成関連タンパク質が炭酸カルシウムの結晶化を調節することにより形成される。真珠養殖ではこの原理を利用し、アコヤガイの外套膜の断片を、貝殻を丸く削った核に付着させ、これを母貝となる他の個体の体内に移植する。母貝の体内で外套膜上皮細胞は増殖して核を覆い、核の周囲に真珠形成関連タンパク質を分泌することで真珠が作られる(図2)。しかしながら、アコヤガイでは生体内でのタンパク質の機能を解析する技術に限られ、多数ある真珠関連タンパク質のほとんどは機能が不明で、真珠形成を説明する分子機序の詳細は明らかでない。さらにこの数年、次世代シーケンサの登場でアコヤガイに関しても遺伝子情報が膨大になり、機能不明の真珠形成関連タンパク質の数も増大し、真珠形成機構の全体像はますます混沌の中にある。

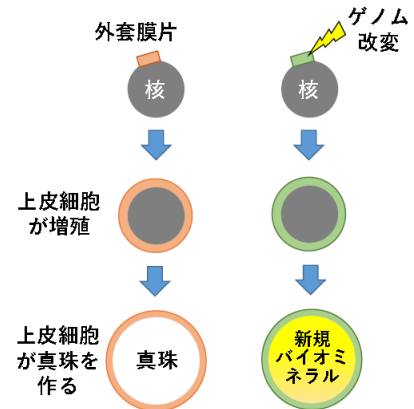


図2. 真珠形成手順(左)と上皮細胞の遺伝子改変による新規バイオミネラル作出(右)

そこで、われわれは、アコヤガイにおける遺伝子の機能解析技術の一つとして、アコヤガイへの遺伝子導入技術について検討してきた。真珠作成の際に使う外套膜上皮細胞に遺伝子導入やゲノム編集を行い、任意に遺伝子を改変した上皮細胞で真珠を作る技術が開発できれば、真珠関連タンパク質の構造や発現を操作し、これまででないアプローチで真珠のバイオミネラリゼーションのメカニズムに迫れる。また、この技術を確認することができれば、例えば真珠と同じ炭酸カルシウム結晶であるが構造が全く異なるサンゴ骨格など、他生物種のバイオミネラル関連タンパク質を導入することで、真珠貝をバイオリクターとして全く新しい性質を持つバイオミネラルの創出技術にもつながると考えた(図2)。

2. 研究の目的

以上から、本研究では、代表的な真珠貝でゲノム等知見の蓄積も多いアコヤガイを対象に、遺伝子導入やゲノム編集によるゲノム改変を外套膜上皮細胞に施し、これら上皮細胞を使った真珠作成技術を確認することを目的とした。

3. 研究の方法

アコヤガイ外套膜片および外套膜上皮への遺伝子導入

アコヤガイから外套膜片および外套膜表面上皮細胞を採取した。上皮細胞については、研究協力者の淡路らの開発した手法に基づき、外套膜から粘液を除去後、ディスパーゼ/コラゲナーゼで処理して上皮細胞を分離した。さらにヒアルロニダーゼで細胞を洗浄し、遠心分離により細胞を細胞塊として回収した。アコヤガイ細胞で働くことが知られるサイトメガロウィルス

(CMV)プロモーターを利用し、CMVプロモーターの制御下で hrGFP や DsRed 等の蛍光タンパク質を発現するレポーターコンストラクトを用いた。これを数百 ng/μl 程度に調製し、分離した外套膜上皮細胞への導入を行った。また、*in vitro* 転写により合成した GFP mRNA の導入も行った。遺伝子導入法は、リポフェクション、パーティクルガン、エレクトロポレーションを検討した。リポフェクションでは Lipofectamine 3000 Reagent 等の試薬を用い、パーティクルガンは Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System、エレクトロポレーションは Neon Transfection System を用いた。遺伝子導入後 1~数日程度で蛍光顕微鏡を用いた観察を行い、導入した遺伝子の発現を確認した。

CRISPR/Cas9 システムによるアコヤガイのゲノム編集

CRISPR design tool を用い、アコヤガイゲノムデータベースから適当な真珠形成関連遺伝子をターゲットとする gRNA を設計した。T7 プロモーター配列をつけたプライマーで gRNA の鋳型を増幅後、*in vivo* transcription で gRNA を作成した。これを Cas9 タンパク質と共に、2 年齢のアコヤガイの閉殻筋にシリンジを用いて注入した。用いたシリンジは 23G × 1 1/4 とした。コントロールとして、PBS のみをインジェクションした個体も作成した。導入後 3 - 5 日飼育し、各個体から外套膜、鰓、足、閉殻筋を採取した。各組織から DNA を抽出し、ターゲットとした配列を含む周辺領域数百 bp を PCR で増幅後、heteroduplex mobility assay (HMA)により変異を検出した。変異を検出できた個体については、PCR 産物をサブクローニング後、サンガーシーケンスにより変異の有無を確認した。

4 . 研究成果

アコヤガイ外套膜片および外套膜上皮への遺伝子導入方法の検討

CMV プロモーター下流でレポーター遺伝子を発現するレポーターコンストラクトを導入した結果、レポーター遺伝子の蛍光は、いずれの方法および条件でも確認できなかった。一方、mRNA をエレクトロポレーション法 (パルス条件 : 1300 v, 30 msec, 1 回) により導入した細胞では GFP の発現を確認することができた。ただし、GFP の発現量は少なく、ウェスタンブロットングでは GFP タンパク質を検出できなかった。

本研究では細胞に加えて、真珠養殖での移植に使う外套膜片に対しての遺伝子導入も試みた。CMV プロモーターの

下流で hrGFP を発現するレポーターコンストラクトにつき、リポフェクションとパーティクルガンの二つの手法による導入効率を比較検討した結果、リポフェクション法においては、蛍光顕微鏡による発現確認では導入を確認できなかったが、金粒子を核酸でコーティングし、高圧で細胞内に打ち込むパーティクルガンについては、蛍光顕微鏡による観察で一部細胞における外来遺伝子の発現を確認することができた (図 3)。ただし、発現が認められたのは遺伝子導入

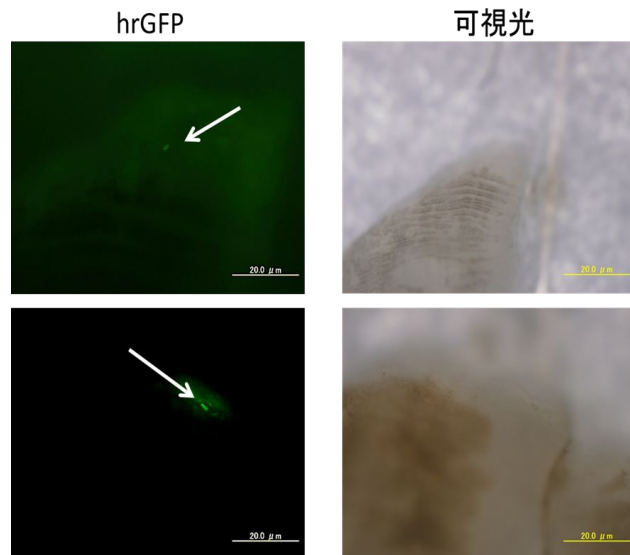


図 3. 外套膜片の細胞への遺伝子導入 . 一部の細胞で外来遺伝子 hrGFP の発現を確認した .

を行った 25 個の組織片中 3 個で、また組織片のごく一部の細胞が発現しているだけであり、導入効率は低かった。

導入効率の改善には、細胞を覆う粘液の除去などが必要と考えられる。また、CMV プロモーター下での発現が確認できなかったことに関しては、CMV プロモーターの活性がアコヤガイの外殻膜外面上皮細胞では弱いことも考えられ、マガキでの活性が報告されている熱ショックタンパク質プロモーターやアコヤガイ遺伝子のプロモーターなどの利用を検討する必要がある。

CRISPR/Cas9 システムによるアコヤガイのゲノム編集

外殻膜上皮細胞で発現し真珠に含まれるタンパク質である nacrein を対象に、Cas9 タンパク質と gRNA を導入した。各組織の DNA を鋳型に、変異導入箇所を含む領域を PCR で増幅し、HMA を行ったところ、4 個体中 3 個体で、変異に由来すると思われるコントロールにはみられないバンドを検出した (図 4)。PCR 産物の塩基配列を決定したところ、変異導入個体において、nacrein 遺伝子中の gRNA 結合部位近傍 45bp を欠損する配列を検出した。当該配列は nacrein 遺伝子中の繰り返し配列に相当し、PCR 増幅中のエラーにより配列の欠損が生じたことも考えられたが、コントロール個体由来の PCR 産物ではこうした変異は検出されないこと、PCR エラーの少ない DNA ポリメラーゼで PCR を行った場合も同様の変異が検出されることなどから、当該欠損がゲノム編集により導入された可能性が考えられた。ただし、チロシナーゼ遺伝子をターゲットとして同様の実験を行ったが、これまでに変異導入を確認できていない。遺伝子によってゲノム編集効率には大きな差があることが知られるため、本手法についてはさらなる検証が必要である。

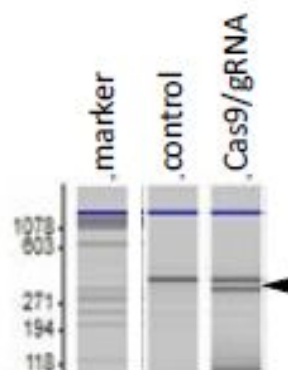


図 4. アコヤガイのゲノム編集の HMA による検出。コントロールに対し、Cas9 タンパク質とガイド RNA を導入した個体では矢印に記した場所に変異由来と思われるバンドを検出した。

まとめ

以上のように、外殻膜上皮細胞へのゲノム改変を試み、少なくとも遺伝子導入については、一定の成果を得ることができた。アコヤガイの貝殻や真珠形成関連遺伝子の機能解析を行うための技術基盤として重要な成果であると考えられる。また、外来遺伝子導入細胞を用いた新規バイオミネラル作出技術の確立にもつながることが期待される。一方で、遺伝子導入効率等でさらに改善が必要であり、アコヤガイ由来のプロモーターの使用や受精卵への導入等を検討する必要がある。また、アコヤガイへのゲノム編集については確実な変異の導入を確認するに至っておらず、複数の遺伝子を対象に結果の検証を進めると共に、細胞や受精卵へのゲノム編集も検討したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

木下滋晴, 篠原幹拓, 吉武和敏, 浅川修一, 舩原大輔, 柿沼誠, 竹内猛, 佐藤矩行, 淡路雅彦, 前山薫, 永井清仁, 渡部終五、真珠層の色調を決定する遺伝、真珠研究シンポジウム 2018、2018

Kinoshita Shigeharu, Shinohara Mikihiro, Tang Engkong, Asakawa Shuichi, Funabara Daisuke, Kakinuma Makoto, Maeyama Kaoru, Nagai Kiyohito, Awaji Masahiko, Watabe Shugo. Comparative RNAseq analysis between pearl sacs producing pearls with different yellow color tones. BIOMIN XIV, 2018

Mariom, Yoshitake K, Kinoshita S, Asakawa S, Maeyama K, Nagai K & Watabe S. Microstructural characterization of surface depositions on pearls produced in *Pinctada fucata*. 平成 31 年度公益社団法人日本水産学会春季大会, 2019

〔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.suikou.fs.a.u-tokyo.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：柿沼誠

ローマ字氏名：Kakinuma, Makoto

所属研究機関名：三重大学

部局名：生物資源科学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 60303757

(2)研究協力者

研究協力者氏名：淡路雅彦

ローマ字氏名：Awaji, Masahiko

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。