

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02272

研究課題名(和文) 魚卵を標的とした物質輸送システムの開発：バイオリアクターによる輸送体の大量生産

研究課題名(英文) Development of a molecular delivery system targeting to fish eggs:
mass-production of the transporter by bio-reactor

研究代表者

平松 尚志 (Hiramatsu, Naoshi)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：10443920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の最終目標は、魚類の親魚から卵や仔稚魚へ様々な有効物質を輸送する新規な分子輸送システムを開発することである。本研究では、小型魚のメダカを用い、卵母細胞への輸送を担うペプチドに蛍光蛋白質やリンカー蛋白質を付加したモデル輸送体を生産する遺伝子組換え魚の作出に成功し、モデル輸送体の輸送性状を確認した。これにより、将来的に大型魚を用いた生物工場の開発へ向けた技術基盤を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、有効物質を自由に魚卵・仔魚へ輸送できるようになると、将来的に創造性に富んだ様々な応用利用が期待できる。例えば、病原菌に対する抗体や抗菌物質の卵への輸送は、種苗の防疫に役立ち、また、遺伝子ベクター等の輸送は、簡便で大量処理の可能な遺伝子導入・欠損技術開発へ繋がる。さらに、生体内での組換え蛋白質生産技術を転用し、輸送体と融合した任意の組換え有効蛋白質を魚類の血液中に大量分泌し、魚卵に蓄積させる生物工場が実現できる。これにより、親魚催熟用の組換えホルモン生産や、他脊椎動物に比べ入畜共通感染症のリスクも低いことから、ヒトを対象とした組換え創薬生産への実用化も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The final goal of this study is to develop a novel molecular delivery system which delivers various efficient substances from mother fish to the eggs and the offsprings. This study successfully produced gene modified medaka (a model fish with small size), which produced transporter peptides fused with fluorescent proteins or a linker protein; such model transporters were confirmed the ability in the delivery into the medaka oocytes. Thus we obtained basic knowledge and tools for the future development of the bio-reactor using a large-sized fish.

研究分野：魚類繁殖生理及びその応用

キーワード：バイオリアクター ピテロジェニン 魚卵 物質輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞又は組織特異的に発現する受容体を標的とした物質輸送システム(受容体標的輸送システム)は、特定の細胞(癌細胞など)に薬剤などを運搬する試みとして、主に医学分野において実用化が図られてきた。同システム(輸送ユニット)は、「被運搬分子」、「輸送体」、並びにそれらを繋ぐ「架橋」の3つのコンポーネントから成り、「被運搬分子」や「輸送体」を変更することで、ヒトばかりでなく様々な生物の特定の細胞へ、多様な物質の運搬が可能となる。

性成熟期に入った魚類のメスは卵母細胞内に卵黄を蓄積する。卵黄蛋白質の前駆物質はピテロジェニン(Vtg)と呼ばれるエストロジェン応答性の血清蛋白質である。Vtgは肝臓で活発に合成され、血液中に分泌された後、Vtg分子上の受容体結合領域(Vitellogenin-Receptor Binding Peptide: VRBP)を介して卵母細胞表面上の受容体と結合し、大量・急速且つ特異的に卵母細胞内に取込まれる。これらの背景から、申請者は、本研究課題の核心である学術的な問いに至った。即ち、「VRBPを輸送体として利用することにより、魚類の卵母細胞に多様な有効物質を輸送でき、水産学を含む様々な研究分野の課題解決に繋がるのではないか?」と考え、以下の研究事業実施に至った。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、魚類の親魚から卵や仔稚魚へ、様々な有効物質を輸送する新規な分子輸送システムの開発である。その際、VRBPを輸送体として利用するが、機能的な輸送体の大量生産に至った例は無い。本申請における到達目標は、遺伝子組換え技術を用い、VRBPに架橋分子(単量体ストレプトアビジン:mSA)や蛍光蛋白質を付加したモデル輸送体の魚類生体内生産を行い、その生産性や輸送性状について解析することである。モデル魚として繁殖サイクルの早いメダカを用い、上記モデル輸送体の生体内生産システムの開発とその輸送性状解析を研究期間内に効率良く行い、将来的に大型の魚種を利用した生物工場(バイオリクター)を開発する上での技術基盤を得ることを目的とした以下の実験を行った。

3. 研究の方法

本研究の遺伝子組換えメダカの作出には、試験開始当初はCAGプロモーター下で全身強制発現性の組換え蛋白質生産が可能なpCAGGSベクターとメガヌクレアーゼI-SceIを用いたpCAGGS/I-SceIシステムを用いたが、その後、pT2AL200R150ベクター(pT2ベクター)とトランスポザーゼ(TP)を用いるpT2/TPシステムに切り替えた。後者のシステムでは、肝臓にてエストロジェン感受性の高発現が期待できるVtg遺伝子プロモーターを用いた。

試験期間中に主に使用した組換え用ベクターには、プロモーターとして2種類(トラウトVtgAsa遺伝子およびメダカVtgAa1遺伝子由来)の下流に、トラウトまたはメダカ由来の輸送体部として5種類(リポピテリン重鎖領域:LvH、LvHを短縮した1500bp領域:1500SE、さらに短縮した900bp領域:900SE、予想VRBPのみからなる領域:SE、VRBPの受容体結合中心領域:Core)、架橋1種類(mSA)、モデル蛍光蛋白質として2種類(赤色蛍光蛋白質mCherry:mCh、緑色蛍光蛋白質:Gfp)を組み合わせて構築した複数の組換え用pT2ベクターを作製した。メダカVtg遺伝子プロモーター領域は、常法によりクローニングを行い、プロモーターアッセイ(ルシフェラーゼアッセイ)により転写活性性状を確認すると共に、各Vtg遺伝子の転写産物発現及びそれら由来の卵黄蛋白質成分組成を、リアルタイム定量PCR法及びLC-MSMS分析により定量し、最も転写活性が高いと予想されるプロモーターの選択情報を得た。これらベクターをI-SceIメ

ガヌクレアーゼあるいはTP mRNAと共にメダカ受精卵へ顕微注入し、孵化・育成したものを初世代(F0)とした。F0で組換えが確認でき交配可能な状況にあったものは、F0同士あるいは野生型と交配し、F1やF2世代を得た。メダカゲノムへの遺伝子導入(組換え)確認に関しては、mSAやmChを標的とするPCR増幅検査により行った。また、肝臓での組換え輸送体転写産物発現は、逆転写PCRによる予想転写産物全体のPCR増幅とcDNAクローニング、シーケンシングにより行った。蛍光蛋白質を含む組換え輸送体蛋白質発現は、孵化仔魚あるいは成魚オスをエストロジェン暴露した後に蛍光実体顕微鏡下で観察、あるいは成魚メスが産した卵や同メスから得た組織の蛍光性を同様に観察した。更に、組換え輸送体蛋白質発現は、肝臓、血液、卵巣あるいは卵を試料とし、mChあるいはmSAに対する抗体を用いたウェスタンブロッティング(WB)により行った。

4. 研究成果

本研究では、試験開始当初はpCAGGS/I-SceIシステムを用いた2種類の組換え魚作出が実施された。しかし、組換え効率が低かったため、以降の試験では、pT2/TPシステムに切り替えた。その際、プロモーターをトラウトの主要Vtg遺伝子(VtgAsa)のプロモーターに変更すると共に、更なる発現能力の向上を期待して、ホスト種であるメダカのVtg遺伝子プロモーターも用いることとした。メダカにおける4種のVtg遺伝子のうち、どのVtg遺伝子プロモーターが適しているかについて検討した。その結果、メダカの4種Vtg遺伝子のプロモーター領域のcDNAクローニングに成功した。プロモーターアッセイとリアルタイム定量PCR測定を行った結果、VtgAa1タイプが最も発現優勢なサブタイプであり、次にVtgAbタイプであることが明らかになった。この結果は卵黄におけるVtgサブタイプ組成のLCMSMS解析でも同様の傾向を示した。これらの成果の一部は、原著論文として発表した(Namgung et al., 2021)。以上、トラウトVtgAsa遺伝子プロモーター(以下、tVGP)に加え、メダカVtgAa1遺伝子由来のプロモーター領域(mVGP)を選択しpT2/TPシステムに組み込んだ。

pT2/TPシステムでは、試験期間中、合計8種類の組換えメダカの作出を試み、そのうち、7種類の組換えメダカF0世代の作出に成功した。その7種類の中から、期間中に、5種類の組換え系統の継代(F1あるいはF2)に成功した。更に、5種類中、4種類の組換えメダカについて、遺伝子転写産物発現や組換え蛋白質生産の解析を行った。

事業前半に作出したtVGP/SE/mChコンストラクトを導入した組換えメダカ(tVGP/SE/mCh系統)においては、F2では100%の個体で組換えが確認され系統化ができた。tVGP/SE/mCh系統の仔魚・若年魚をエストロジェン暴露した結果、肝臓のみに強い蛍光性が誘導された。同系統非暴露のメス成魚でも、肝臓に強い蛍光が確認された他、卵巣卵にも蛍光性が確認できたものの、卵巣卵では肝臓と比較し弱い蛍光性を示した。また、排卵卵では蛍光性が消失した。卵巣において蛍光性が弱い原因を組換え蛋白質発現量の不足と考え、メダカ由来のプロモーターを用いる事で改善することを期待し、mVGP/SE/mCh系統を作出した。組換えメス個体(F0)を成魚まで育成し、肝臓・卵巣での蛍光観察を行った結果、肝臓のみに蛍光性が観察された。肝臓・血液・卵巣抽出試料を用いてa-mCh抗体を用いた発色系のWBを行った結果、肝臓では免疫陽性反応を示すバンドが確認できたものの、血液や卵巣では確認できず、肝臓からの蛍光輸送体蛋白質の分泌が無い、もしくは極めて少ない可能性が示唆された。ここで、卵巣での蛍光性が確認できない主要因を、mVGP下流に配置したトラウトVtg由来SEの不連続性に起因する肝臓からの蛍光輸送体の分泌不全によるものと考えた。そこで、mVGP下流に同Vtgのシグナルペプチドとそれに直接続くSEを含む900bpの受容体結合部位とmChを配置し、組換えメダカの作出を試みた結果、F2までのmVGP/900SE/mChメダカの系統化に成功した。mVGP/900SE/mCh系統の発現・分泌と卵へ

の輸送性状を確認した結果、肝臓で強い蛍光性が確認でき、卵母細胞や排卵卵では確認できなかった。一方、cDNAクローニング及び化学発光WBでは、肝臓における輸送体転写産物及び輸送体蛋白質の発現が確認でき、同蛋白質の卵巣への輸送も確認できた。ここで、化学発光WBにより検出された免疫陽性バンドのサイズから、肝細胞内で生産された900SE/mCh蛋白質の大部分が、血液への分泌前にmChのN末端側で切断されている可能性が示唆された。以上により、完全な900SE/mCh蛋白質は血流へ分泌され、卵母細胞へ運搬されたと考えられ、本研究の輸送システムのコンセプトが検証できた。しかし、多くの900SE/mCh蛋白質は肝臓で分解され、蛍光性を持たない900SE部分のみの形で分泌され、一方で残りのmCh部分は分泌されずに肝臓に残り強い蛍光性を顕したと考えられた。

上記mVGP/900SE/mCh系統のmChをmSAに置換えたmVGP/900SE/mSA組換えメダカの作出を試み、F1組換え系統の作出に成功した。同組換え系統では、肝臓における輸送体転写産物のcDNAクローニングに成功し、組換え蛋白質の転写産物発現が、同系統メダカの生体内で予想通り機能していることを明らかにした。一方で、mSAに対する抗体(a-mSA)を作製し、これを用い、上記系統の肝臓、血液、卵のWBを行ったものの、900SE/mSA蛋白質は検出できなかった。この理由は、900SE/mSA産生が少ない個体であった可能性や、900SEとmSAが融合することによりa-mSAの結合性が失われた可能性があるが、原因解明には至らなかった。しかし、同系統では転写産物の発現が確認できていることから、900SE/mSAの検出系を再検討することで、今後その分泌と輸送性状を確認できるであろう。

以上、本研究では、少なくとも2系統(tVGP/SE/mCh及びmVGP/900SE/mCh)の組換えメダカにおいて、モデル蛍光輸送体(SE/mChまたは900SE/mCh)の「転写産物発現・蛋白質生産、血液への分泌、卵巣への輸送」の一連のコンセプトが機能することを、蛍光観察のみでは検証できない部分はあったものの、免疫化学的手法を組み合わせることで実証できた。一方で、今回、組換えメダカの生体内で生産された900SE/mChは、その大部分が肝臓において血流への分泌前に分解される可能性が示唆され、同コンセプトの蛍光観察による明瞭な検証には、mChの部分を、肝臓で分解を受けない別の蛍光蛋白質へ変更する必要があると考えられた。また、通常、魚類のVtgは2量体を形成し、血流を介して卵母細胞へ取り込まれる。mChは単量体であり、輸送体の2量体形成を阻害し卵母細胞への取込み率を低下させていた可能性もある。この様な考えから、本研究課題の最終年度では、mChを2量体の緑色蛍光蛋白質(Gfp)に置換えた組換えメダカ系統を追加作出し、F0組換え魚の作出に成功した。本事業期間内では、900SE/Gfp輸送体の分泌や輸送性の確認には至っていないが、今後、明瞭なコンセプト証明に繋がるツールを獲得できたと考えている。

本研究の進展により、有効物質を自由に魚卵・仔魚へ輸送できるようになると、将来的に創造性に富んだ様々な応用利用が期待できる。これまで、本研究にて実証を図った輸送システムと似たシステムを用いて、卵へモデル蛍光蛋白質等を輸送した先行例はあるものの、実用的な応用例は無い。今後、本研究の進展に伴い期待される応用例として以下に数例を記述する。

(1) 防疫は増養殖上の大きな課題である。病原菌に対する抗体、あるいは抗菌物質等の卵への効率的輸送は、種苗の防疫に役立つと期待される。

(2) 遺伝子組換え・ゲノム編集技術は、基礎生物学的解析手法あるいは先端的な水産育種応用技術として注目されている。本研究の輸送システムを応用することで、親魚に投与するだけで、一度に全ての卵へ遺伝子ベクター等を輸送できる可能性があり、簡便で大量処理の可能な遺伝子導入・欠損技術開発へ繋がると期待される。

(3) mChやmSA配列は任意の有効蛋白質配列に変更できる。即ち、VRBPと融合した任意の組換え

有効蛋白質を魚類の血液中に大量分泌し、魚卵に蓄積させる生物工場が実現できる。魚類の生物工場化は、親魚催熟用の組換えホルモン生産や、他脊椎動物に比べ人畜共通感染症のリスクも低いことから、ヒトを対象とした組換え創薬生産への実用化も期待される。小型魚であるメダカを用いて得られた本研究の成果は、将来的に大型の魚種を利用した有効蛋白質の生物工場（バイオリクター）を開発する上での技術基盤を提供したと考えられる。

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 0件）

1. 著者名 Nangung Jin, Mizuta Hiroko, Yamaguchi Yo, Nagata Jun, Todo Takashi, Yilmaz Ozlem, Hiramatsu Naoshi	4. 巻 257
2. 論文標題 Knock out of a major vitellogenin receptor gene with eight ligand binding repeats in medaka (<i>Oryzias latipes</i>) using the CRISPR/Cas9 system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology	6. 最初と最後の頁 110967 ~ 110967
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cbpa.2021.110967	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島哲也・南宮眞・永井優里・永田淳・筵平裕次・川上浩一・東藤孝・平松尚志
2. 発表標題 メダカ卵への物質輸送システム開発における同主要ピテロジェニンAa1プロモーターの利用
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飛田野祥平、東藤孝、平松尚志
2. 発表標題 魚類卵母細胞への物質輸送システムの開発：蛍光輸送体を発現する遺伝子組換えメダカの作出
3. 学会等名 令和元年度日本動物学会北海道支部第64回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://hlaboratory.g2.xrea.com/>

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	東藤 孝 (Todo Takashi) (60303111)	北海道大学・水産科学研究院・准教授 (10101)	

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
---------	---------