

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580308

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ胚における細胞膜透過性シグナル分子の時空間的発現と制御

研究課題名(英文)Development of a novel technology to introduce signal transduction molecules into zebrafish embryo using membrane-translocating motif

研究代表者

花澤 重正 (HANAZAWA, Shigemasa)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60060258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、蛋白質工学的アプローチにより細胞膜透過性ペプチド(MTM: Membrane Translocating Motif)と機能性蛋白質を融合させたキメラ蛋白質を精製・作製し、ゼブラフィッシュ初期胚へ本分子を高効率に細胞内へ取り込ませ、タンパクの機能を発現させる手法を開発するとともに、導入したキメラ蛋白質の時空間的発現動態と制御について生物応答に基づき解析する。本分子の導入は、研究の目的に応じて各初期胚ステージを選択することが可能であることから、多様な生命現象に関与する分子の応答や局在・分布を顕微鏡下で観察できることから極めて独創的なバイオアッセイ系である。

研究成果の概要(英文)： Membrane translocating motif (MTM) composes a signal peptide sequence of hydrophobic amino acid residues, AAVLLPVLLAAP. To develop a technology to introduce directly signal transducing molecules into zebrafish embryos, we generated a recombinant MTM-tagged p53 (MTM-p53) in E.coli and then examined the transcriptional activity of the purified MTM-p53 in vitro and in vivo. we developed in here a novel transducing technology that is able to directly introduce to zebrafish and then to functionally act MTM-p53 protein. This provides a useful approach to understand the spatiotemporal regulatory mechanism(s) of signal transducing molecules in zebrafish.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 細胞膜透過性ペプチド シグナル分子 キメラ蛋白質 形態形成 細胞分化 可視化

### 1.研究開始当初の背景

遺伝子機能を把握するには、ベクター由来の外来 DNA や RNA を細胞内へ導入し、蛋白質の過剰発現、あるいは翻訳の抑制・阻害細胞機能を解析する手法が広く利用されてきた。しかし、本研究は、これら手法とは異なり、蛋白質工学的アプローチにより細胞膜透過性ペプチド (MTM: Membrane Translocating Motif) と機能性蛋白質を融合させたキメラ蛋白質を調製し、これらキメラ蛋白質を生体内又は細胞内に導入し、その蛋白質の機能を解析すること、更にゼブラフィッシュ胚にこれら蛋白質を導入する事により生体内での目的とする蛋白質を可視化し、時空間的にその機能を解析するものである。

### 2.研究の目的

本研究は、蛋白質工学的アプローチにより細胞膜透過性ペプチドと機能性蛋白質を融合させたキメラ蛋白質を作製し、ゼブラフィッシュ初期胚へ本分子を導入し、蛋白質の機能を発現させる手法を開発するとともに、導入したキメラ蛋白質の時空間的発現動態と制御について生物応答に基づき解析する。本分子の導入は、研究の目的に応じて各初期胚ステージを選択することが可能なことから、細胞分裂、組織・器官の発達、分化・増殖、形態形成、アポトーシスなどの生命現象が顕微鏡下で可視化し、解析する事を目的とする。

### 3.研究の方法

- (1) MTM 融合 eGFP 蛋白質の精製の確立: MTM 非融合 eGFP および MTM 融合 eGFP 蛋白質は、pET 発現システムを使ってニッケルアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。
- (2) ゼブラフィッシュ胚および仔魚への細胞膜透過性シグナル分子の導入と発現動態: 各組織への導入を可視化するために、eGFP シグナル分子を胚および仔稚魚に注入した。
- (3) 細胞膜透過性シグナル分子注入後のゼブラフィッシュ組織内発現の局在: eGFP シグナル分子を受精卵および仔稚魚に注入後、各組織切片について免疫染色を行い、細胞内への MTM 非融合 eGFP、MTM 融合 eGFP 蛋白質の導入を確認した。
- (4) 細胞膜シグナル分子導入ゼブラフィッシュにおけるその機能の保持: ゼブラフィッシュ受精卵の内在性 p53 はモルフォリノアンチセンスオリゴでノックダウンし、外来性の MTM 融合 p53 蛋白質の機能性を確認した。
- (5) ゼブラフィッシュにおける細胞膜透過性 p53 の発ガン抑制とアポトーシス誘導: この p53 ノックアウトゼブラフィッシュの受精卵に細胞膜透過性 p53 を導入し、その発ガン率に関する抑制効果を調べることにより、細胞膜透過性 p53 の *in vivo* における機能

の発現について評価した。

### 4.研究成果

- (1) MTM 融合 eGFPp53 の精製を確立と細胞内発現: MTM 非融合 eGFP および MTM 融合 eGFPp53 を pET 発現システムを使ってニッケルアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。pET28a ベクターに MTM が有・無になるように eGFP をサブクローニングし、そのベクターを大腸菌 (BL21 (DE3)) に形質転換した。形質転換した大腸菌から MTM 非融合 eGFP あるいは MTM 融合 eGFPp53 を精製した。得られたそれぞれの大腸菌は、TB 液体培地抗生物質カナマイシン依存下で震盪培養し、IPTG を添加し、さらに 3 時間震盪培養した。培養後、菌を遠心分画により回収し、超音波によって菌を破碎し、遠心分画により水溶性蛋白質と不溶性蛋白質に分離した。不溶性蛋白質 (MTM 非融合 eGFP、MTM 融合 eGFPp53) に可溶化溶液を加え、37 °C で緩やかに 3 時間震盪して不溶性 p53 を可溶化した。可溶化した p53 から Ni-NTA purification system を用いて MTM 非融合 eGFP あるいは MTM 融合 eGFPp53 を精製した。MTM 非融合 eGFP、MTM 融合 eGFPp53 の N 末端側に 6 個の連続する Histidine 残基を含んでおり、Ni<sup>2+</sup> に特異的に結合することによって目的とする p53 を回収した。また、1 時間置くことにより各 p53 のリフォールディングを行った。1 時間後、溶質溶液を加え、Ni<sup>2+</sup> の結合を外し目的の p53 を PBS で一晩透析した。精製した MTM 非融合 eGFP、MTM 融合 eGFPp53 を胚または仔魚の血中に注入した結果、組織内、特に細胞内での発現を観察した。
- (2) 自然免疫及び獲得免疫の負の制御因子 (TIPE2) のクローニングと TIPE2 ノックアウトゼブラフィッシュの確立: TIPE2 がゼブラフィッシュでは 2 種類 (TIPE2a、TIPE2b) 存在することを遺伝子クローニングから明らかにした。TIPE2 ノックアウトゼブラフィッシュを作製したところ、ゼブラフィッシュの頭部組織形成に異常が生じた。このことから TIPE2 はゼブラフィッシュの形態形成に関わっている可能性が考えられた。そこで、この点を詳細に検討するため、ヒト TIPE2 抗体を用いてノックアウトゼブラフィッシュ組織における TIPE2 発現の有無を検討した。まず、ゼブラフィッシュ胎児細胞 (ZE 細胞) に zTIPE2a、zTIPE2b をそれぞれ強制発現させ、ウェスタンブロット法によりヒト TIPE2 抗体を用いて検出を行い、その相同性を確認した。その結果、ZE 細胞に強制発現させた zTIPE2a 及び zTIPE2b 蛋白質はヒト TIPE2 抗体により明らかに反応した。故に、TIPE2 ノックアウトゼブラフィッシュ胚における TIPE2 発現についてヒト TIPE2 抗体を用いて調べた。その結果、ZE 細胞に強制発現させた zTIPE2a 及び zTIPE2b 蛋白質はヒト TIPE2 抗体により明らかに反応した。故に、TIPE2 ノ

ックアウトゼブラフィッシュ胚における TIPE2 発現についてヒト TIPE2 抗体を用いて調べた。その結果、TIPE2 発現は認められなかったことから、TIPE2 ノックアウトゼブラフィッシュが作製できたものとする。今後、この点をより詳細に検討したい。

(3)ゼブラフィッシュの胚における MTM 融合 p53 の機能発現:ゼブラフィッシュ胚由来の ZE 細胞における p21 の転写量をルシフェラーゼアッセイで調べたところ、MTM 融合 p53 は p21 の転写活性を誘導した。そこで、その機能が *in vivo* においても維持されているかを調べるため、p21-GFP トランスジェニックゼブラフィッシュを作成した。p21-GFP トランスジェニックゼブラフィッシュにおける GFP の発現誘導は野生型ゼブラフィッシュ胚における内因性 p21 の発現誘導と一致した。この結果は p21-GFP の zp21-promoter が内因性 p53 に応答することを示すことから、MTM-53 蛋白質 p21-GFP を胚に実際に導入し、その機能発現を介して GFP が誘導されるかについて共焦点レーザー顕微鏡並びに Western blot 法を用いて検討した。GFP の発現が頭部および眼などで観察できた。このことから野生型ゼブラフィッシュ胚の内因性 p21 も同様の箇所が発現するかを Whole-mount *in situ* hybridization 法で調べた。その結果、p21 の発現が頭部及び眼で観察できた。以上、ゼブラフィッシュの胚における細胞膜透過性シグナル分子の時空間的発現と制御を解析する実験モデルを作成することができた。

## 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 4 件)

- (1) Yabu T, Shiba H, Shibasaki Y, Nakanishi T, Imamura S, Touhata K, Yamashita M. Stress-induced ceramide generation and apoptosis via the phosphorylation and activation of SMase1. *Cell Death. Differ.* 22,258-273, 2015 査読 有  
DOI: 0.10.1038/cdd.2014.128.Epub 2014 Aug. 29.
- (2) Matsuura Y, Yabu T, Shiba H, Moritomo T, Nakanishi T. Identification of an ovel fish granzyme involved in cell-mediated immunity. *Dev. Compl Immunol.* 150, 499-507, 2014 査読 有  
DOI: 0.1016/j.dci.2014.06.006.Epub 2014 Jun. 23.
- (3) Y. Shibasaki, T. Yabu, K. Araki, N. Mano, H,

Shiba, T. Moritomo, T. Nakanishi. Peculiar monomeric interferon gammas, IFN rel1 and IFN rel2 in ginbuna crucian carp.

*FEBS J.* 281,1046-1050, 2013 査読 有  
Doi: 10.1111/febs.12666.Epub 2013 Dec. 23.

- (4) Ohkubo M, Yabu T, Yamashita M, Shimizu A. Molecular cloning of two gonadotropin receptors in mummichog *Fundulus heteroclitus* and their gene expression during follicular development and maturation. *Gen Comp Endocrinol.* 2013 Apr. 1;184:75-86. 査読 有  
Doi: 10.1016/j.ygcen.2012.12.019. Epub 2013 Jan. 19.

[学会発表](計 3 件)

- (1)黒木利知、大野芳典、安永晋一郎、竹立恭子、山藤幹茂子、舩廣善和、花澤重正、大坪素秋、瀧原義宏: 膜貫通性リコンビナント Geminin タンパク質は、造血幹細胞の自己複製と細胞分化を制御する新たなストラテジーを提供するだろう。  
第 37 回日本分子生物学会 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜  
2014 年 11 月 24 日~ 11 月 27 日
- (2)中野利沙、櫻井渉、大徳満隆、松本翔太、宮本梓、舩廣善和、花澤重正: TIPE2 は TAK1 を介する *H.pylori* CagA シグナルを負に制御する。  
第 37 回日本分子生物学会 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜  
2014 年 11 月 24 日~2014 年 11 月 27 日
- (3)藪健史、司馬肇、柴崎康宏、中西照幸、今村伸太郎、山下倫明  
ストレスによる SAPK/JNK の活性化とストレス誘導性アポトーシスにおける中性スフィンゴミエリナーゼ 1 のリン酸化。  
第 86 回日本生化学会 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜  
2013 年 09 月 11 日~2013 年 09 月 13 日

## 6. 研究組織

- (1)研究代表者  
花澤 重正 (HANAZAWA, Shigemasa)  
日本大学・物資源科学部・教授  
研究者番号: 60060258
- (2)研究分担者  
舩廣 善和 (MASUHIRO, Yoshikazu)  
日本大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号: 00336083

藪 健史 (YABU, Takeshi)

日本大学・生物資源科学部・研究員

研究者番号：00551756

今村 伸太郎 (IMAMURA, Shintarou)

独立行政法人水産総合研究センター・

研究員

研究者番号：80510007

(3)連携研究者

( )

研究者番号：