

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14797

研究課題名(和文) 魚類の卵母細胞を標的とする分子輸送体を産生するトランスジェニックメダカの作製

研究課題名(英文) Generation of transgenic Medaka producing a transporter targeting to fish oocytes

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、親魚から卵・仔魚へ様々な有効物質を輸送できる分子輸送システムの開発を目指し、遺伝子組換え魚によるモデル分子輸送体の生産に挑戦し、将来的な生物工場(バイオリクター)開発に向けた萌芽的技術基盤を得ることを目的とした。卵母細胞への輸送部位、蛍光蛋白質、リンカー、遺伝子組換え導入システムを複数組み合わせて発現コンストラクトを作製し、最終的に、蛍光性モデル輸送体あるいはリンカー付きモデル輸送体を産生する第2世代(F1)と第3世代(F2: 蛍光性モデル輸送体のみ)を得た。本研究の成果により、今後同輸送体の大量生体内生産に向けた新たな試験系の確立に有効な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to obtain the first technical basis for the development of a bio-reactor system through the production of model transporters in transgenic fish, with the final goal of which constructs a system transporting various effective materials across generations (i.e., from mother to egg or larva) in fish. Various expression constructs were generated by combining transporters, fluorescent proteins, a linker, trans-genic vector systems. Trans-genic medaka expressing fluorescent model transporters, as well as a model transporter with a linker, were produced as the second (F1) and the third (F2, the fluorescent transporter alone) trans-genic generations. This study provided fundamental knowledge for the next examination toward a massive bio-production of the transporters.

研究分野：魚類繁殖生理学

キーワード：分子輸送 バイオリクター 卵 ビテロジェニン メダカ 生物工学

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、これまで主に医学分野において実用化が図られてきた(Boado et al., 2008)。同システムは、組織特異的な輸送性状を特徴とし、特定の細胞(ガン細胞等)へ直接投薬できる等の利点を持つ。運搬される有効物質群(エフェクター)は、薬剤のみならず抗体・遺伝子ベクターなど多様であり、一方、輸送体には、標的受容体に特異的なリガンド等が利用されている。エフェクター・輸送体間の架橋は、アビジン・ビオチン系が良く利用されている。

魚類において、性成熟期に入った雌は卵母細胞内への卵黄蓄積を開始する。卵黄の前駆物質はビテロジェニン(Vtg)と呼ばれる血清蛋白質である。Vtgはその一部であるリポビテリン重鎖(LvH)部位を介して受容体と結合し、エンドサイトーシスにより大量・急速且つ特異的に卵母細胞内に取込まれる。Vtgに由来する卵黄成分は卵の80%以上を占め、胚や仔稚魚の発生・成長に利用される。これらの背景から、申請者は、Vtg(LvH)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エフェクター物質を導入することが可能となると考え、本研究の発想に至った。

近年、強制発現系を用いた遺伝子組換え魚の作製に際し、様々な遺伝子導入システムが利用されている。本研究では、過去に実績のあるトランスポゾン転移を利用するpT2ベクター/Transposaseシステム(Kawakami et al., 2016)とメガ酵素 I-Sce I によるゲノム切断・修復を利用するpCAGGSベクター/I-Sce I システム(Kaneko et al., 2015)が報告されている。将来的に輸送体の大量生産を目指すには、適切な組換え・発現システムを選択する必要がある。しかし、これら異なるシステムの比較を同一魚種で行った例はない。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、魚類の親魚から卵・仔稚魚へ、世代を超えて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。その際、卵母細胞に特異的な受容体(ビテロジェニン受容体)を標的とし、そのリガンドであるビテロジェニン(Vtg)の一部(リポビテリン重鎖:LvH)を輸送体として利用する。本申請における到達目標は、トランスジェニック技術を用い、LvHに直接架橋分子(単量体アビジン:mSA)を付加したキメラ輸送体の生体内生産に挑戦し、その性状解析を行うことである。モデルとして繁殖サイクルの早いメダカを用い、同キメラ輸送体の生産システムの開発とその輸送性状解析を試験期間内に効率良く行い、将来的に他魚種を利用した生物工場(バイオリクター)を開発する上での萌芽的な技術基盤を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究課題では、先ず輸送体を発現するトランスジェニック(Tg)メダカの作製を試みる。その際、第1段階として、LvHに蛍光蛋白質を付加したキメラ輸送体の生体内生産を試みる。この蛍光輸送体は蛍光顕微鏡観察により可視化されるため、発現・輸送性状を直接確認できる。第1段階にて蛍光輸送体の発現が確認された段階で、並行して第2段階でLvHに直接架橋分子を付加したキメラ輸送体(LvH-mSA)の生体内生産を試みる。組換え輸送体がメダカ生体内で十分量生産されていると確認できた場合、輸送体の性状・機能解析を試みることを予定した。以下に、手法について記述する。

(1) 発現ベクターコンストラクトの作製

本研究では、魚類における遺伝子組換え個体の作製に実績のある強制発現ベクター2種(pCAGGS及びpT2AL200R150G)を選択した。第1段階の蛍光輸送体の作製には、上記ベクターに、発現インサートとしてLvH又はネガティブコントロールとなるLv軽鎖(LvL)に赤色蛍光蛋白質DsRed又はmCherry(mCh)を融合した計5種のコンストラクト:

pCAGGS/LvH/DsRed

pT2AL200R150G/LvH/DsRed

pT2AL200R150G/LvL/DsRed

pT2AL200R150G/LvH/mCh

pT2AL200R150G/LvL/mCh

を作製した。また、pCAGGSとpT2AL200R150Gシステムを比較するため、緑色蛍光蛋白質(GFP)を単独コードする以下の2種コンストラクトも作製した。

pCAGGS/GFP

pT2AL200R150G/GFP

第2段階のリンカー付き輸送体LvH-mSAを発現インサートとするベクターコンストラクトは以下のものを作製した。

pCAGGS/LvH/mSA

作製したプラスミドは、全てシーケンス解析に供し、インサート配列を確認した。

(2) 初世代組換えメダカの作製

遺伝子組換えに使用したミナミメダカ受精卵は、北海道大学水産学部環境制御実験棟内に設置した循環水槽内で継代飼育している親魚から得た。受精直後の卵にマイクロインジェクション法により顕微注入を行った。pCAGGSベクターをベースとした上記コンストラクトはI-Sce-Iメガヌクレアーゼと共注入し、pT2AL200R150Gベクターをベースとした上記コンストラクトはtransposase mRNAと共注入した。尚、transposase mRNAはpCS-TPベクターからmMESSAGE MACHINE SP6 kitを用いて作製した。顕微注入後のメダカ受精卵は10cmのシャーレ内に脱塩素水道水と共に収容し、25℃に調温したインキュベーター

ター内で2-3週間程度培養・孵化した後、環境制御実験棟内の循環水槽へ移送し、飼育を継続した。

(3) F0における蛍光性孵化率の観察

蛍光蛋白質あるいはその融合蛋白質を発現する組換えメダカについては、受精2日後にM205FA電動蛍光実体顕微鏡を用いて蛍光性の有無を確認した。また、蛍光性を示した個体の飼育を継続し孵化させた。最初の処理卵数に対する蛍光個体の孵化個体数の割合を蛍光性孵化率(%)として算出した。

(4) 組換えメダカ交配

pT2AL200R150GベクターをベースとしたLvH/mCh及びLvL/mCh組換えメダカでは、蛍光性が確認されたF0同士を交配し、F1を得た。また、LvH/mCh導入F1と野生型メダカを交配しF2を得た。一方、pCAGGS/LvH/mSAを導入したF0メダカ同士を交配し、F1を得た。

各遺伝子導入の確認は、各組換えインサート配列中にプライマーを設計し、受精2-3日後の受精卵全体あるいは成魚では尾鰭の一部から抽出したゲノムDNAを鋳型としてPCRにより確認した。PCR産物の一部はクローニング後にシーケンシングにより塩基配列を決定し、目的のインサート配列を確認した。受精卵全体数に対する組換え受精卵数の割合を組換え遺伝率(%)として算出した。

LvH/mCh及びLvL/mCh組換えメダカF0交配にて得たF1及びF2受精卵は、上記蛍光顕微鏡にて蛍光性を観察した。

4. 研究成果

(1) 蛍光輸送体発現組換えメダカの作出

本研究では、第1段階として、蛍光輸送体を発現する組換えメダカの作出を試みた。初めに、DsRedを蛍光源とする3種の輸送体強制発現ベクターのうち、LvHと融合したインサートを含むpT2AL200R150G/LvH/DsRedを用い、顕微注入によりメダカ受精卵へ遺伝子導入を試みた。その結果、顕微注入F0胚に顕著な赤色蛍光は観察できなかった。そのため、残りの2種類のベクターでの試験を中止し、蛍光強度の増強を試みた。

蛍光強度を上げるため、蛍光源をDsRedから蛍光強度が4倍程度高いmChへ変更したpT2AL200R150Gベクターを作製し、顕微注入を行った。その結果、LvH/mCh及びLvL/mCh導入群共に、受精・注入後2日目の胚には赤色蛍光が観察され、その後に孵化に至る個体も確認できた。LvH/mCh導入について、至適ベクター・transposase mRNA濃度下で施術した群(n=106)、およびシャムコントロール群(n=88)を比較したところ、前者の孵化率は約21%、後者のそれは約65%であった。このことは、実験群におけるいずれかの遺伝子導入因子自体の影響により、あるいは実際に遺伝子導入が起こったことを起因として致死性となる場合が増えることを示した。しか

し、同じ条件で孵化に至る個体もいることから、必ずしも全ての実験群の個体がそれらの影響を受けるわけではないことも示した。一方、前者の蛍光性孵化率は、約14%であった。この結果は、以降の交配試験の継続に十分な導入率と考えられ、同様な条件で遺伝子導入を繰り返し、以下の実験に用いた。

上記のように作出したLvH/mChおよびLvL/mCh群のF0孵化個体を性成熟段階まで育成し、各群毎にF0雌雄の交配を行った。得られた受精後2日目のF1胚について、蛍光性や遺伝子導入を確認した結果、LvH/mCh及びLvL/mChの各受精卵(F1)では、卵黄に顕著な蛍光性は確認できなかった。LvL/mCh群では37%(7/19)の遺伝率でLvL/mCh配列の導入が確認された。一方、LvH/mCh群ではF1個体と野生魚の交配で得た授精卵(F2)について56%(5/9)の遺伝率でLvH/mCh配列の導入が確認された。またLvH/mChの授精卵(F2)の一部では、卵全体に赤色蛍光が確認された。これにより、LvHが輸送能を持つ可能性が強く示唆された。



図1. LvH/mCh群F2受精卵の蛍光像

(2) 2種の強制発現系の比較

2種の強制発現コンストラクト(pCAGGS/GFP及びpT2AL200R150G/GFP)を作製し、各々メダカの受精卵へISce-I及びtransposase mRNAと共に顕微注入した結果、受精2日後の野生型胚では蛍光が観察されず、pT2AL200R150G/GFPおよびpCAGGS/GFP両処理群で蛍光が観察された。条件検討の結果、調整液の至適終濃度は、pT2AL200R150G/GFPではベクター25 ng/μl、転写酵素mRNA 5 ng/μl、pCAGGS/GFPではベクター10 ng/μl、酵素0.125 unit/μlに決定した。至適条件におけるpT2AL200R150G/GFPおよびpCAGGS/GFPの蛍光性孵化率は、それぞれ20.0%および23.5%となった。蛍光性孵化率が20%以上となる濃度条件が得られたためTg魚の作製が可能な条件であると判断した。至適条件下で作出した胚の蛍光の強さを、両システムで比較するとpCAGGS/GFPがpT2AL200R150G/GFPよりも有意に高かった。以上、至適条件下では両システムの蛍光性孵化率はほとんど同様であ

るものの、I-Sce-I システムにおいて、より強いEGFPの発現が確認された。

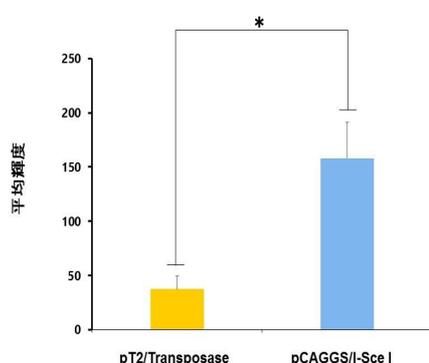


図2．二種の強制発現ベクター系 (pT2 及び pCAGGS) の蛍光性比較

(3) 架橋輸送体発現組換えメダカの作出
上記において、2種の強制発現系を比較した結果、pCAGGS系により強い発現が見られた。そのため、LvHとリンカー(ストレプトアビジン単量体:mSA)の配列を含むコンストラクト pCAGGS/LvH/mSA、及び緑色蛍光蛋白質EGFPの配列を含む pCAGGS/GFP を作製し、両者を I-Sce1 と共に受精卵に共注入した。緑色蛍光を発し、孵化した F0 個体同士を育成し、成魚の尾鰭から DNA 抽出と PCR を行った結果、複数個体で LvH-mSA の導入が確認できた。LvH-mSA 導入 F0 個体同士を交配し得た受精卵(F1)では緑色蛍光が確認され、75% (3/4) の遺伝率で LvH-mSA の導入が確認できた。

(4) まとめと展望

以上、本研究では、受容体結合部位LvHと蛍光蛋白質(mCh)あるいはLvHとリンカー(mSA)の融合蛋白質を発現する組換えF0親系統から、最終的に第2世代(F1)と第3世代(F2:LvH/mChのみ)を得ることに成功した。またLvH/mCh組換えメダカF2胚(受精卵)では、微弱ではあるが赤色蛍光が確認できた。これらの成果より、到達目標である遺伝子組換え技術によるモデル分子輸送体生産のうち、少なくとも蛍光輸送体の生体内生産が確認された。また、推定された受容体結合部位(LvH及びLvL)のうち、LvHが機能的であることが示唆された。一方、F2での蛍光性が低いという結果は、組換え蛋白質の生産性が低いことを示している。そのため、リンカー付き輸送体(LvH/mSA)組換えメダカを用いて輸送体機能試験を継続するには、新たにプロモーター変更による生産性の向上が必須と考えられた。本試験ではLvH/mSA組換え系統(F1)作出に成功したことを以て計画を終了し、今後同輸送体の大量生体内生産に向けた新たな試験系の確立に有効な知見を得た。

<引用文献>

Kawakami, K., Asakawa, K., Muto, A., Wada, H. Tol2-mediated transgenesis, gene trapping, enhancer trapping, and Gal4-UAS system. Zebrafish: Genetics, Genomics, and Transcriptomics, 4th edition. 135, 2016, 19-37.

Kaneko, H., Ijiri, S., Kobayashi, T., Izumi, H., Kuramochi, Y., Wang, D.S., Mizuno, S., Nagahama, Y. Gonadal soma-derived factor (gsdf), a TGF-beta superfamily gene, induces testis differentiation in the teleost fish *Oreochromis niloticus*. Mol. Cell. Endocrinol. 415C, 2015, 87-99.

Boado, JR., Zhang, YF, Zhang, Y., Xia, CF., Wang, YT., Pardridge, WM. Genetic engineering, expression, and activity of a chimeric monoclonal antibody-avidin fusion protein for receptor-mediated delivery of biotinylated drugs in humans. Bioconjugate Chem. 19(3), 2008, 731-739.

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)

[学会発表](計1件)

塚原杏奈・吉田達哉・荻平裕次・東藤孝・平松尚志、遺伝子導入メダカ初世代における組換え蛋白質の発現：pT2/Transposase システムと pCAGGS/I-SceI システムの比較、H29年度日本水産学会北海道支部大会、北海道大学(北海道、札幌市) 12月9日、2017年。

[その他](計3件)

研究会・アウトリーチ活動

平松尚志・東藤孝、平成29年度オープンキャンパス高校生限定プログラム「魚の卵を科学しよう!」北海道大学(北海道、函館市) 8月7日、2017年。

平松尚志、第1回食科学プラットフォーム「水産ブロック」意見交換会「魚の卵を科学する～基礎から応用への共同研究の可能性」北海道立総合研究機構(北海道、室蘭市)、9月6日、2016年。

平松尚志、成28年度(第30回)北海道大学水産学部公開講座「弁天町発!!水産・海洋研究の最前線」：第4回 魚の卵を科学する、北海道大学(北海道、函館市) 7月30日、2016年。

ホームページ等

<http://www.geocities.jp/hlaboratory/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平松 尚志 (HIRAMATSU, Naoshi)
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号：100443920

(2)連携研究者
井尻 成保 (IJIRI, Shigeho)
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号：90425421

川上 浩一 (KAWAKAMI, Koichi)
国立遺伝学研究所・教授
研究者番号：70195948