

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14979

研究課題名（和文）バキュロウイルス遺伝子導入系の魚類生殖生理研究における利用技術開発

研究課題名（英文）Development of vaculovirus gene transfer system for fish reproductive studies

研究代表者

井尻 成保 (Ijiri, Shigeho)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：90425421

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：従来の方法では遺伝子導入が困難な魚類細胞へのバキュロウイルス遺伝子導入システムを検討した。ウナギ腎臓由来細胞株EK1細胞では、トランスポゾン遺伝子転移システムを用いなくてもEK1細胞ゲノムへの外来遺伝子の組み込みに成功した。これを利用したウナギ濾胞刺激ホルモン遺伝子のEK1細胞ゲノムへの組み込みは達成できず、ウイルス強度を上げるなどの条件改良がさらに必要である。生体組織および受精卵胚への外来遺伝子導入も観察されず、さらに条件検討を重ねる必要がある。以上、EK1細胞ゲノムへ外来遺伝子を導入する手法が初めて確立され、今後様々な外来遺伝子発現EK1細胞を作製できるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来法ではEK1細胞ゲノムに外来遺伝子を導入することはできなかった。バキュロウイルスによりトランスポゾン系を用いなくともEK1細胞ゲノムに外来遺伝子を高い効率で組み込むことに成功した意義は大きい。予想外の結果であり、ゲノムへの遺伝子導入に関して新たな研究展開が開かれた。

トランスポゾンが必要としないことからEK1細胞ゲノムへの外来遺伝子導入は技術的に容易となった。本研究では道半ばではあるが、ウナギ濾胞刺激ホルモン産生EK1細胞が作製できれば、新しい人為催熟法が確立される。これを例に、ウナギの生体内に様々な外来遺伝子由来のタンパク質を導入できると期待され、様々な応用研究が可能となる。

研究成果の概要（英文）：Vaculovirus gene transfer system into fish cells, that were usually found difficulty in transfection, was attempted in this study. In eel kidney derived cell line (EK1 cell), vaculovirus system enabled to introduce exogenous gene into host genome without using transposon gene transfer system. Using this novel method, we could not complete to introduce eel follicle stimulating hormone gene into EK1 genome. Further technical improvement would be necessary to establish EK1 cells that stably produce eel hormone. This system did not complete to introduce gene into live fish tissues and fish embryo, which indicates further technical development would be required. In conclusion, a method which enable to introduce exogenous gene into EK1 genome was established at the first time. This novel method is a revolutionary method which enables to construct EK1 cells that produce desired protein in a stable fashion.

研究分野：魚類生殖生理学

キーワード：バキュロウイルス 遺伝子導入 魚類細胞 ウナギ 濾胞刺激ホルモン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

魚類生殖生理研究において魚類細胞への外来遺伝子の導入が求められる局面は少なくない。しかし、多くの場合、魚類培養細胞ではホ乳類培養細胞で一般的に用いられる化学的導入法や物理的導入法では遺伝子導入効率は極めて悪い。さらに、卵巣や精巣などの器官培養組織に外来遺伝子を導入することはほとんどできない。一方、受精卵への遺伝子導入はメダカやゼブラフィッシュなどの一部のモデル動物では高い効率でマイクロインジェクション(顕微注射)による導入が行われているが、水産重要魚種であるティラピア、ウナギやチョウザメでは顕微注射の効率は悪く、さらにその後の生残率も著しく低下するという問題が存在する。

ホ乳類培養細胞では高効率で染色体に外来遺伝子を導入することができるレンチウイルス等を利用した遺伝子導入法が広く利用されている。ウイルスを介した方法は導入効率が高いだけでなく、長期間、安定に遺伝子発現が続き、また、細胞分裂後も確実に伝搬されるという大きな利点がある。しかし、魚類培養細胞では、培養温度が低いこともあり、これらホ乳類細胞で用いられるウイルスが感染する可能性は低く、それ故、利用は難しい。

ところが、2013年に、Yokooらは、バキュロウイルス AcMNPV を、Drosophila Mos1 トランスポゾンと共感染させることで、キングサーモン胚性培養細胞染色体に外来遺伝子を高い効率で導入することに成功した。この結果は、バキュロウイルス遺伝子導入系によって、様々な魚類細胞の染色体へ外来遺伝子を高効率かつ簡便に導入できる可能性を示している。このことから、バキュロウイルス遺伝子導入系が魚類生殖研究において、遺伝子導入が困難な局面において技術的ブレイクスルーをもたらす可能性があると考えられた。また、大量の魚類培養細胞に容易に外来遺伝子を導入できることから、作製した組換え培養細胞を生体に戻すことによって様々な応用研究が展開できると考えられる。

実面的な面からは、ウナギ人為催熟への応用が考えられる。ウナギの養殖は、河口で漁獲される稚魚を育成することで行われるが、近年その漁獲量は激減している。そのため、人工種苗生産技術の開発が進められている。その際、ウナギは飼育下では性成熟は進まないため、サケ脳下垂体抽出物(SPE)を毎週注射することで2カ月程度かけて卵黄形成を促進し、その後、卵成熟・排卵を誘導して卵を得ている。しかし、その卵質は概して悪い。卵黄形成促進は濾胞刺激ホルモン(FSH)、卵成熟は黄体形成ホルモン(LH)によって制御されているが、SPEはLHリッチで、FSHはほぼ含まれていない。ウナギにサケLHを用いて催熟していることが良質卵が得られにくい1つの理由であると考えられるが、生体内で機能する組換えウナギFSHの作製は煩雑で高コストである。それに対し、バキュロウイルス遺伝子導入系を利用すれば低コストで容易に大量のウナギFSH産生EK1細胞を作製でき、それをウナギ腹腔内へ移植することによって人為催熟が行えるのではないかと考えた。

本研究ではまず、CMVプロモーター下流に緑色蛍光タンパク(GFP)遺伝子を組み込んだ配列を含むバキュロウイルスを作製し、GFPを指標に、EK1細胞ゲノムへの外来遺伝子導入方法の検討を行なった。また、受精卵や様々な培養組織、培養細胞へのインフェクションの成否を調べた。また、ウナギFSHを発現するバキュロウイルスの作製に挑戦した。

### 2. 研究の目的

バキュロウイルス遺伝子導入系を利用して以下の課題に取り組む。

- (1) GFP恒久発現ウナギ腎臓由来細胞株(EK1細胞)を作製する。
- (2) ウナギ濾胞刺激ホルモン(FSH)産生バキュロウイルスを作製し、それを利用してウナギFSH産生EK1細胞を作製する。
- (3) 受精卵への顕微注射効率が悪い魚種への高効率遺伝子導入法を開発する。
- (4) 器官培養系における培養組織への遺伝子導入を検討する。

### 3. 研究の方法

- (1) GFP恒久発現ウナギ腎臓由来細胞株(EK1細胞)の作製

プラスミド pFastBac-GFP を大腸菌 DH10Bac に形質転換することで、組換えバクミド(バキュロウイルスゲノム)を作製する。本プラスミドの GFP 遺伝子上流には CMV プロモーターがあり、下流には細胞選択に利用しうるハイグロマイシン遺伝子が組み込まれている。両遺伝子を挟んでトランスポゾン認識配列が配置されている。このバクミドをヨトウガ細胞(Sf9)にトランスフェクションすることによって、GFP 発現バキュロウイルス(GFP-Bacu)を生産する。同時に、トランスポゼース(TP)遺伝子を組み込んだ、TP 発現バキュロウイルス(TP-Bac)も生産する。まず、GFP 発現バキュロウイルスが生産されたかどうかの確認にはヒト胎児腎細胞(HEK293細胞)を用いる。次に、GFP 発現バキュロウイルスを EK1 細胞にインフェクションする。この時、TP 発現バキュロウイルスを共インフェクションする群も設け、EK1 細胞ゲノムへの GFP 遺伝子導入の成否を調べる。EK1 細胞は継代を重ね、GFP 遺伝子の EK1 細胞ゲノムへの取り込みを調べる。

- (2) ウナギ濾胞刺激ホルモン(FSH)産生バキュロウイルス作製と、それを利用したウナギFSH産生EK1細胞の作製

pFastBac-GFP から GFP 配列を抜き取り、代わりにウナギ FSH 配列を挿入する。FSH 配列は、シグナルペプチド配列を除いた FSH サブユニットにスペーサー配列を挟み、シグナルペプチド配列を含んだ GP サブユニット配列をつないだ(pFastBac-eFSH)。浮遊性 HEK293 細胞(HEK293F)

にトランスフェクションし、ウナギ FSH の産生を確認する。FSH 産生が確認されれば、バクミドに組込んでウナギ FSH 産生バキュロウイルス (eFSH-Bacu) を生産する。eFSH-Bacu を EK1 細胞にインフェクションし、FSH の産生を確認する。

(3) 受精卵への顕微注射効率が悪い魚種への高効率遺伝子導入法の開発

GFP-Bacu をテラピアおよびゼブラフィッシュ受精卵の卵膜と胚の間にマイクロインジェクションで注入する。発生に伴う GFP 蛍光の有無を蛍光実体顕微鏡で観察する。

(4) 器官培養系における培養組織への遺伝子導入

GFP-Bacu を様々な魚種の様々な培養組織にインフェクションし、培養組織における GFP 発現の有無を観察する。魚種は、ウナギ、テラピア、チョウザメ、サクラマスを用い、組織は、脳、鰓、頭腎、腎臓、肝臓、脾臓、卵巣、精巣、体腔壁を用いる。組織は、細片化し、L15 培養液中で 2~4 日間培養する。次に、ウナギ腎臓、卵巣、精巣の細胞をプロテアーゼでばらし、初代細胞培養を行なう。これらに GFP-Bac をインフェクションし、培養後の GFP 発現の有無を観察する。

#### 4. 研究成果

(1) GFP 恒久発現ウナギ腎臓由来細胞株 (EK1 細胞) の作製

GFP-Bac は GFP バクミドを SF9 細胞にトランスフェクションして作製した第一世代ウイルスストック (P1) として作製し、次に P1 を SF9 細胞にインフェクションした第二世代ウイルスストックを作製し、これを P2 とした。P2 を用いて同様に P3 を作製した。ウイルス強度を検定するため、P2 および P3 を HEK293 細胞にインフェクションした。インフェクションは SF9 培養後培養液を培養 HEK293 細胞に滴下することで行なった。その結果、P2 ウイルスでは 100% の HEK293 細胞において強い GFP 蛍光が観察された (図 1B)。P3 ウイルスでは GFP 蛍光は弱かった (図 1D)。GFP が観察された HEK293 細胞を継代したところ、継代を重ねるにつれ GFP の発現は弱まったことから、HEK293 細胞ゲノムに GFP 遺伝子が組み込まれたわけではなく、一過性発現であることが分かった。また、P2 ウイルスが強いウイルス強度を持つことが確認された。

次に、P2 ウイルスを EK1 細胞にインフェクションした。EK1 細胞ゲノムへの取り込みを狙い、TP-Bac を共感染させる培養群も併せて設けた。インフェクションから 15 日後に培養液にハイグロマイシンを添加し、選択培養を開始した。インフェクション 3 週間後 (選択培養 6 日目) には GFP-Bac 単独および TP-Bac との共インフェクシ

オン培養群ともに、EK1 細胞において強い GFP 蛍光が観察された (図 2D および E)。バキュロウイルスを感染させていない対照群 EK1 細胞では GFP 蛍光は観察されなかった (図 2F)。

GFP の発現が確認されたことから、ハイグロマイシン存在下での培養を継続した。対照群 EK1 細胞は徐々に細胞が死滅し、選択培養開始 28 日後にはわずかな細胞しか生き残らなかった (図 3C)。一方、インフェクション群では、単独および共インフェクション群ともに EK1 細胞は生存し、また、強い GFP 蛍光も維持された (図 3A, B, D, E)。

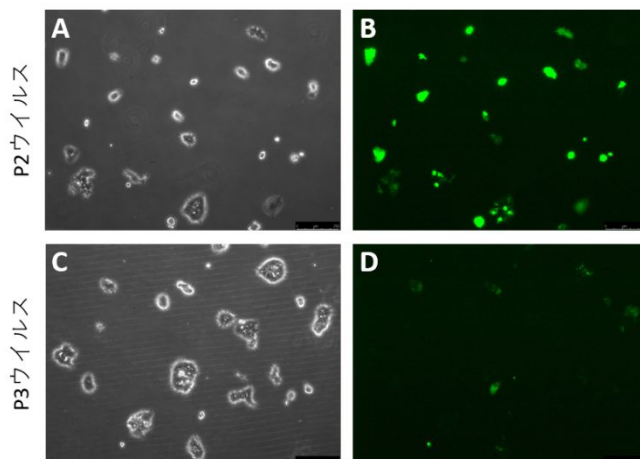


図 1 .GFP-Bacu をインフェクションした HEK293 細胞。A, C : 位相差像、B, D : 蛍光像。A, B : P2 ウイルスインフェクション、C, D : P3 ウイルスインフェクション。

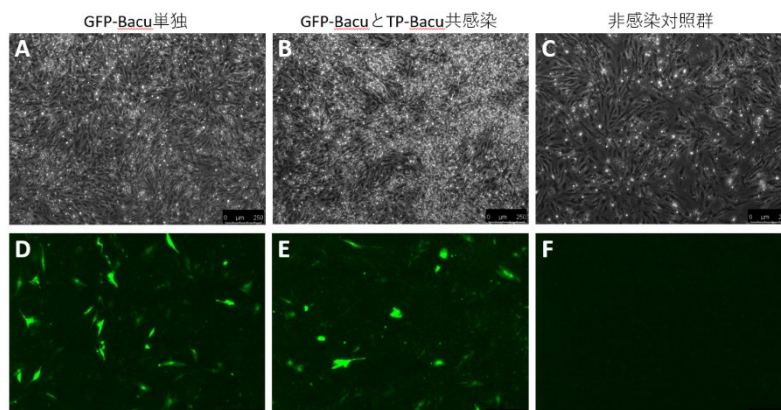


図 2 . GFP-Bacu をインフェクションした 3 週間後の EK1 細胞 (ハイグロマイシン添加 6 日後)。A, B, C : 位相差像。D, E, F : 蛍光像。A, D : GFP-Bacu 単独インフェクション。B, E : GFP-Bacu と TP-Bacu の共インフェクション。C, F : インフェクションしていない対照 EK1 細胞。



GFP 遺伝子の EK1 細胞ゲノムへの取り込みを調べるため、さらに長期の培養を継続した。ハイグロマイシンを添加した状態で継代を重ねると、対照群 EK1 細胞は完全に死滅した。一方、単独および共インフェクション培養群ともに EK1 細胞は増殖を続け、また強い GFP 蛍光も発現が継続した。今現在、培養期間は 5 カ月を超え、この間、5 回の継代培養を行った。驚いたことに、5 回の継代を重ねた今でも GFP-Bacu 単独インフェクション群において EK1 細胞の増殖は継続し、さらに強い GFP 蛍光が観察されている (図 4C)。TP-Bacu との共インフェクション培養群でも同様の様子が観察される (図 4D)。長期にわたり EK1 細胞は細胞分裂を続けており、5 回の継代培養を経た後にもほぼ全ての EK1 細胞で GFP 蛍光が観察されることから、GFP 遺伝子の EK1 細胞ゲノムへの組み込みは成功したと考えられる。

HEK293 細胞に GFP-Bac を単独でインフェクションした場合、細胞分裂に伴い GFP 蛍光を発する細胞数は減少し、また継代することで GFP 蛍光を発する細胞は観察されなくなった。つまり、HEK293 細胞ゲノムには GFP 遺伝子は組み込まれないということであり、これは、バキュロウイルスは動物細胞にインフェクションしても、バクミドは宿主細胞ゲノムに取り込まれず独立して存在し、また、動物細胞内では複製されないという知見に一致する。しかし、EK1 細胞では、バクミドは細胞ゲノムへ取り込まれることが強く示唆された。つまり、EK1 細胞にバキュロウイルス経由で外来遺伝子を導入する場合、トランスポゾンによる外来遺伝子の宿主細胞ゲノムへの転移を利用する必要がない可能性を示している。今後、継代培養を継続し GFP 蛍光発現細胞の維持をさらに長期にわたり確認する必要があるものの、TP-Bacu を作製して共インフェクションする実験の手間が必要ないことは、本システムによる EK1 細胞ゲノムへの外来遺伝子導入が極めて簡単であるということを示している。

## (2) ウナギ濾胞刺激ホルモン (FSH) 産生バキュロウイルス作製と、それを利用したウナギ FSH 産生 EK1 細胞の作製

まず、構築した pFastBac-eFSH がウナギ FSH を生産するかを確認するために、HEK293F 細胞にトランスフェクションし、2 日間の培養後、抗ウナギ FSH サブユニット特異抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、培養後細胞抽出液および培養後培養液ともに FSH 特異的バンドが認められた (図 5 レーン 2,3)。このことから、HEK293F 細胞においてウナギ FSH が産生・分泌されることが確認された。

次に、pFastBac-eFSH を元に生産したウイルス eFSH-Bacu の FSH 産生を確認するために、EK1 細胞に TP-Bacu とともに共インフェクションを行った。インフェクションの 2 週間培養後、培養後 EK1 細胞および培養後培養液をウエスタンブロット解析に供した。しかし、ウナギ FSH の特異

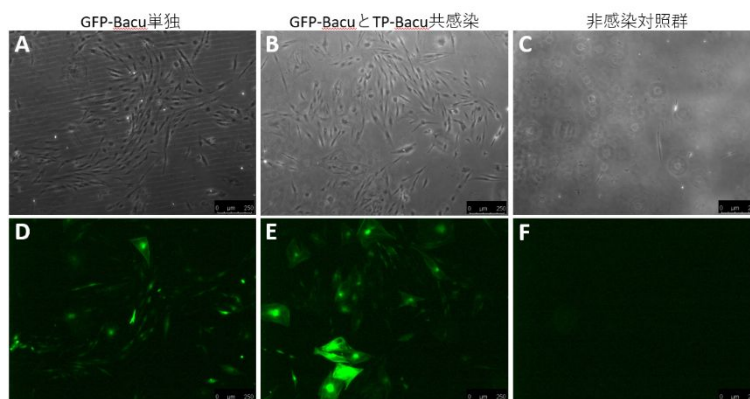


図 3 . GFP-Bacu をインフェクションしたハイグロマイシン添加 28 日後の EK1 細胞。A, B, C : 位相差像、D, E, F : 蛍光像。A, D : GFP-Bacu 単独インフェクション。B, E : GFP-Bacu と TP-Bacu の共インフェクション。C, F : インフェクションしていない対照 EK1 細胞。

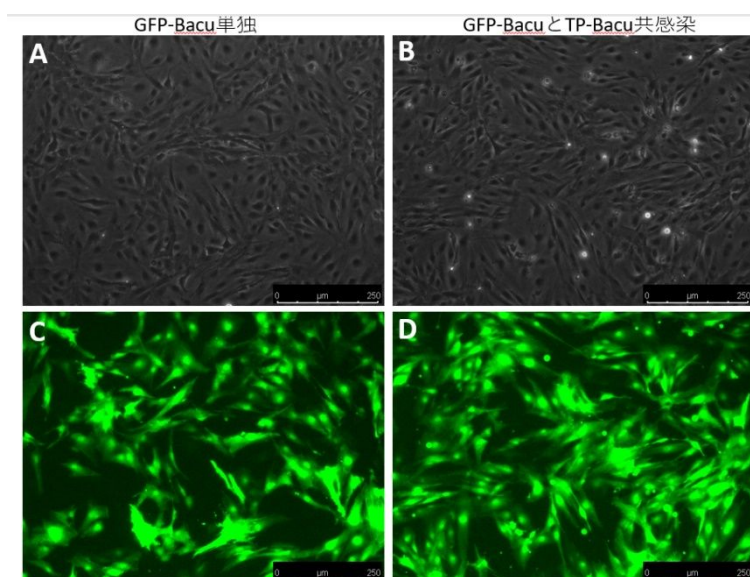


図 4 . GFP-Bacu をインフェクションしたハイグロマイシン添加 5 カ月後の EK1 細胞 (継代培養 5 回)。A, B : 位相差像。C, D : 蛍光像。A, C : GFP-Bacu 単独インフェクション。B, D : GFP-Bacu と TP-Bacu の共インフェクション。

的バンドは確認されなかった。

GFP-Bacu の EK1 細胞へのインフェクションの結果から、インフェクションに成功していれば多量の外来導入遺伝子由来のタンパク質が産生されることは間違いないと考えられる。また、pFastBac-eFSH の HEK293F へのトランスフェクションでウナギ FSH が産生されたことから、pFastBac-eFSH の設計と構築に誤りはないものと考えられる。現状では、eFSH-Bacu をインフェクションした EK1 細胞でウナギ FSH の産生が確認されなかった原因は分からないが、おそらく、バキュロウイルスが十分に作製されていなかったのではないかと推測される。eFSH-Bacu の産生の成否は、ウエスタンブロットによる解析しかないが、インフェクションして培養し、ウエスタンブロット解析の結果を得るまでに時間がかかるため、検討には時間を要する。

### (3) 受精卵への顕微注射効率が悪い魚種への高効率遺伝子導入法の開発

ティラピア、ゼブラフィッシュの受精卵とともに、GFP-Bacu を顕微注入によってインフェクションした。インフェクション後、発生に伴い GFP の観察を経時的に行ったが、GFP 蛍光は観察されなかった。1 細胞期の胚にインフェクションしたため、細胞分裂に伴いバクミドが希釈されたのが原因である可能性が考えられた。今後、インフェクションできるのか否かを明らかにする為には、ある程度細胞分裂が進んだ胚にインフェクションを行う必要があると考えられた。

### (4) 器官培養系における培養組織への遺伝子導入の検討

試行した全ての魚種の全ての培養組織において、GFP 蛍光は観察されなかった。このことから、生体組織に直接バキュロウイルス経路で外来遺伝子を導入することはできないということが分かった。一方、初代培養細胞においては、培養細胞中の一部の細胞で GFP 蛍光が観察された。しかし、EK1 細胞のようにほぼ全細胞への外来遺伝子導入は観察されず、実用性を得るためには、さらに条件検討を重ね、改良点を見つけ出す必要があると考えられた。

以上、(1) の研究成果から、EK1 細胞ゲノムへのバキュロウイルスを用いた外来遺伝子導入は極めて実用性が高いということが示された。しかも、トランスポゼースによる外来遺伝子のゲノムへの転移を必要としないことも強く示唆された。つまりゲノムへの遺伝子導入の作業工程は非常に簡便化できると考えられた。(2) の課題は、現状ではウナギ FSH 産生 EK1 細胞の作製には至らなかったものの、(1) の結果を考慮すると今後条件検討を重ねることでその作製の実現は可能であると考えられた。(3) および (4) の課題については、今後も技術的検討を継続するが、実用性に至ることができるかどうかは不透明な状況であると考えられた。

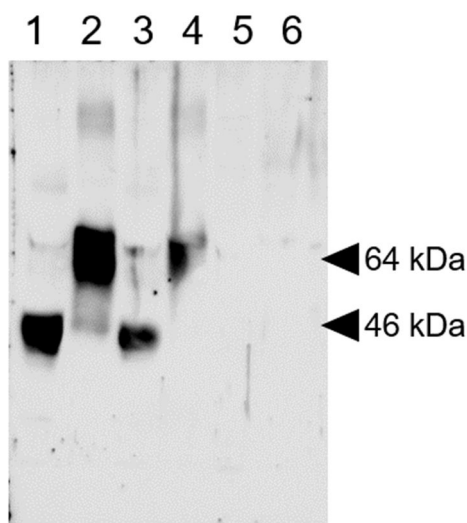


図 5 .HEK293F 細胞培養 2 日後の細胞および培養液中のウナギ FSH のウエスタンブロットによる検出。1,3,5: 細胞抽出液。2,4,6: 培養後培養液。1,2: ウナギ FSH を組み込んだ pCAGGS をトランスフェクション。3,4: pFastBac-eFSH をトランスフェクション。5,6: 対照群、pFastBac-GFP をトランスフェクション。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 陳顧慧・谷口祐介・伴戸久徳・笠井久会・井尻成保・足立伸次
2. 発表標題 バキュロウイルス遺伝子導入系を利用したGFP産生EK1細胞の作製
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 矢部衛、桑村哲生、都木靖彰、井尻成保、他19名	4. 発行年 2017年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 377
3. 書名 魚類学 第14章 生殖（井尻成保執筆）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	笠井 久会  (Kasai Hisae)  (50399995)	北海道大学・水産科学研究科(研究院)・准教授    (10101)	