

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658063

研究課題名（和文） 魚類の特性を活用した新しい iPS 細胞作製技術の開発

研究課題名（英文） Development of fish iPS cells utilizing biological properties of fish

研究代表者

鈴木 徹 (SUZUKI TOHRU)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70344330

研究成果の概要（和文）：魚類で iPS 細胞を開発できれば、凍結細胞での養殖優良系統の保存技術の開発が期待できる。本研究では、魚類 iPS 細胞の開発に向けて基盤技術の開発をめざした。Oct4 プロモーターで GFP を発現するメダカとゼブラフィッシュのトランスジェニックフィッシュ系統を作製し、iPS 化を GFP の緑色蛍光でモニターできる培養系を開発した。胚細胞に Mini-Circle DNA を導入することにより、iPS 細胞を開発できる可能性、再生ヒレに出現する多能性細胞を利用することに、効率的に体細胞を iPS 細化できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Establishment of fish iPS cells is expected to enable the development of new techniques for maintaining selected aquaculture fish strains as frozen cells. This study aims at development of fundamental techniques essential for establishing fish iPS cells. We established medaka and zebrafish transgenic lines that emit GFP fluorescence under the control by *oct4* promoter. We also developed cell culture system in which multipotency of cells can be monitored by GFP fluorescence. In addition, two possibilities on iPS cell production were suggested. First, transfection of Minicircle DNA may transform embryonic cells to iPS cells. Second, multipotent cells that appear in regenerating fin may be efficiently transformed to iPS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	570,000	3,570,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：発生分化、魚類、iPS 細胞、GFP 遺伝子、トランスジェニックフィッシュ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 京都大学の山中博士らにより、哺乳類皮膚由来の培養体細胞に4種類の転写因子 (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc) を遺伝子導入することにより、胚性幹 (ES) 細胞と同等の多能性を付与持つ人工多能性幹 (iPS) 細胞を作製する iPS 化技術が開発された。iPS 細胞

は、再生医療への応用が期待されていた。また、iPS 細胞を生殖細胞に分化することにより、細胞から個体を復元することが可能であることが示されていた。

(2) 養殖対象魚種 (マダイ、ヒラメ等) でも、高成長や耐病性を持つ系統が選抜育種によ

り作出されるようになったが、系統維持には大がかりな飼育施設と人件費が必要であり、低コストな系統維持方法の開発が望まれている。また海面での系統維持は、常に赤潮や魚病による突然の大量斃死の危険性が伴っており、これら危険性を排除できる細胞での系統維持方法の開発が望まれている。

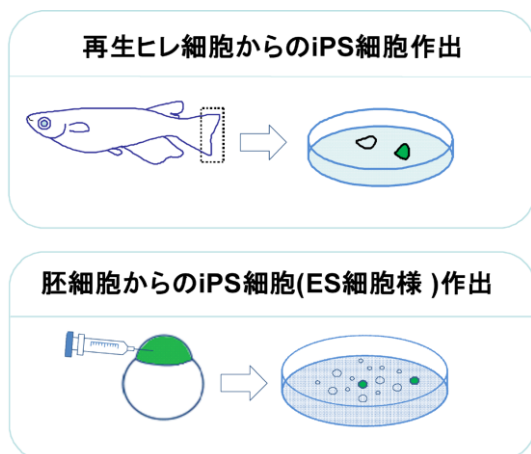
(3) 申請者は、魚類で iPS 細胞を開発できれば、水産分野のブレークスルーとなる新技術開発が期待できると考えた。例えば優良系統を iPS 細胞として凍結保存し、必要な時に細胞を起こして、優良系統を復元する技術開発で、大型魚系統を細胞として保存することが可能となると着想した。

(4) モデルフィッシュとして広く発生研究で利用されているゼブラフィッシュとメダカを含め、魚類では iPS 細胞に関する研究は未着手の状態であった。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、魚類 iPS 細胞の開発に必要な基盤技術を開発し、iPS 化に必要な技術開発を試みることを最大の目的とする。

(2) 魚類では、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子をレポーターに使うことで多能性を蛍光でモニターできるトランスジェニックフィッシュの開発が可能である。また魚類では、胚細胞に遺伝子導入して iPS 化することに倫理的な問題は全くない。ヒレは切断後に短時間のうちに再生することが知られており、再生過程で多能性を獲得した細胞が出現している可能性が高い。これら魚類の生物学的な特性を生かして、魚類 iPS 細胞の開発を進める。



(3) 胚細胞が多能性を持つ時期だけ、細胞が緑色蛍光タンパク質 (GFP) の蛍光を発光するトランスジェニックフィッシュを開発する。

(4) トランスジェニックフィッシュの細胞を使って GFP 蛍光で iPS 化をモニターする培養系を開発する。

(5) マウスで最初に開発された iPS 化技術では、ウィルスベクターを使って遺伝子を導入している。本研究では養殖への応用を視野に入れているので、ウィルスベクターの使用は避けることとした。哺乳類細胞の iPS 化に最近開発された Reprogramming Minicircle DNA、モルフォリノオリゴによるアンチセンスノックダウン技術、iPS 化効果が報告されている各種試薬類を使って、iPS 化を試みることにした。

(6) 多能性を維持するのに効率的な細胞培養方法を開発する。

## 3. 研究の方法

(1) トラフグの *oct4* 遺伝子のプロモーター領域を約 2 kb クローニングし、プロモーターレスの EGFP ベクターにサブクローニングして、Oct4 promoter/EGFP 発現ベクターを製作した。発現ベクターをメダカ及びゼブラフィッシュ受精卵に顕微注入し、トランスジェニックフィッシュを作製した。

(2) Reprogramming Minicircle DNA (Lin28, Nanog, Sox2, Oct4, GFP を発現) を購入し、受精卵の細胞質に顕微注入した。注入した胚は、そのまま発生させるか、あるいは体軸形成前の段階で卵膜を除去して細胞培養に供した。

## 4. 研究成果

(1) 多能性をモニターする *Oct4*/EGFP Tg メダカおよびゼブラフィッシュ系統の樹立

メダカ及びゼブラフィッシュとも、安定的に GFP 蛍光を発光するトランスジェニック系統を開発することができた。胚細胞は、多能性を有する卵割期から、体節期まで GFP 蛍光発

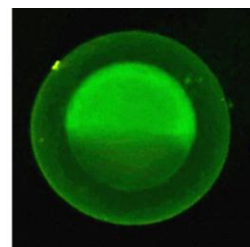


図1. Oct4/EGFP Tgゼブラフィッシュ胚(受精後5時間)の緑色蛍光

光し、その後、組織分化の進行に伴い蛍光発光は停止した(図1)。作製したトランスジェニック系統は、細胞の多能性をモニターに利用できると示された。

(2) ヒレ再生で出現する多能性細胞

2種類のトランスジェニック系統の成魚のヒレを切断し、ヒレ再生過程で GFP 蛍光により多能性細胞が出現するかどうかを試験

した。メダカのトランスジェニック系統では、ヒレの再生芽に強い GFP 蛍光を発する細胞集団が出現することが観察された (図2)。一方、ゼブラフィシュの系統では再生芽に GFP 蛍光は出現せず、理由は不明であるが同じベクターを導入したのにも関わらず蛍光の発現パターンに種差が認められた。

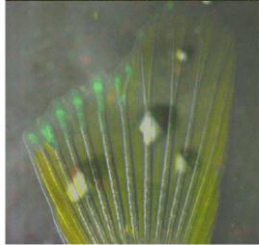


図2. Oct4/EGFP Tgメダカの再生ヒレで出現する GFP 蛍光を発する多能性細胞

ヒレ再生過程では、皮膚と鰭条の骨格が急速に再生するものと考えられ、GFP 蛍光を発する細胞は再生に必要な細胞を供給する幹細胞である可能性が考えられた。

### (3) ヒレ細胞由来の多能性細胞

メダカのトランスジェニック系統では再生ヒレで蛍光発光する細胞が出現したので、培養条件でも蛍光発光する細胞が出現するか試験したところ、ヒレ片の末端から GFP 蛍光を発する細胞が遊走することが観察された (図3左)。またトリプシン消化で分散して培養したヒレ細胞でも蛍光発光する細胞が出現した (図3右)。したがって、魚類の場合、ヒレを培養するだけで、多能性を持った幹細胞が得られる可能性が考えられる。また今回開発したトランスジェニック系統を使うことにより、iPS 化を蛍光モニターで判定で優れた実験系を開発できたものと考えられる。今後は、GFP 蛍光細胞がどの程度の分化能を有するかを検討する必要がある。

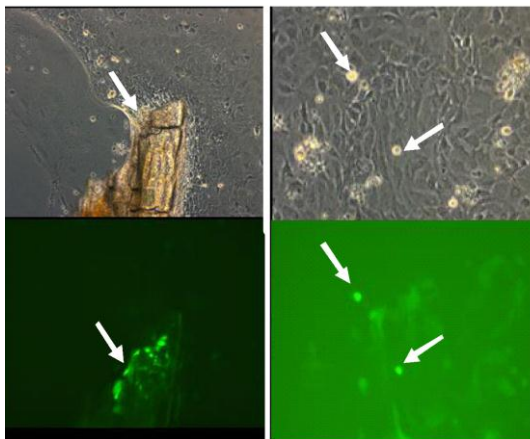


図3. Oct4/EGFP Tgメダカの培養ヒレ細胞から出現する緑色蛍光を発する多能性細胞 (矢印)。左: ヒレ片培養。右: ヒレを消化して得られた細胞。

### (4) 多能性を維持する培養法の開発

胚細胞は通常のプレート上での培養では、

色素胞、筋細胞等に分化するが、コラーゲン膜を張った培養カップを使うと、胚細胞が胚葉体 (胚細胞が多能性を維持した状態にある) を形成した状態で長期間培養できることが明らかになった (図4)。本方法は、魚類細胞の iPS 化に有効であると考えられた。

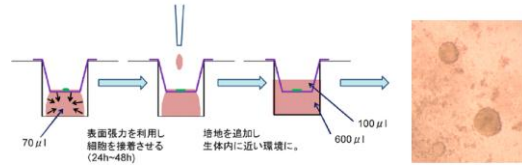


図4. 胚細胞の多能性を維持する培養法。胚細胞は長期間、胚葉体様の構造を維持する

### (5) Minicircle DNA の魚類細胞への効果

ゼブラフィシュ (非トランスジェニック) の受精卵に Minicircle DNA を顕微注入したところ、8 時間後に Minicircle DNA 由来の GFP 蛍光が観察された (図5)。顕微注入した胚は、細胞の分化が抑制され、胚細胞は細胞塊を形成した。これらの結果から、Minicircle DNA にコードされる 4 種類の iPS 化遺伝子が魚類細胞でもタンパク質に翻訳されること、発現により細胞の分化が強く抑制されることが明らかになった。これらの結果から、Minicircle DNA を顕微注入することにより、胚細胞の多能性を人為的に延長でき、胚細胞を iPS 化することが可能だと考えられた。

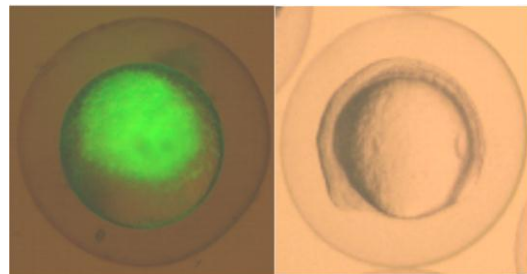


図5. Minicircle DNA を顕微注入した胚 (左) と正常胚 (右)

### (6) 魚類 iPS 細胞開発に向けて

本研究では、①多能性と iPS 化を GFP 蛍光でモニターできる実験系、② 多能性維持に適した培養方法を開発し、さらに③再生ヒレに多能性細胞が出現すること、④Minicircle DNA が魚類細胞でも機能して多能性を付与することを明らかにした。魚類細胞の iPS 化には、以下の 2 つの方法が有効だと考える。① 胚細胞に Minicircle DNA を顕微注入したうえで、開発した培養法で細胞を維持して iPS 化する。② 培養ヒレ細胞に Minicircle DNA を導入し、開発した培養法で細胞を維持して iPS 化する。今回の挑戦的萌芽で得られた成

果をふまえ、できるだけ早期に魚類 iPS 細胞の開発を実現化したいと考えている。

#### 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鷺尾洋平、有瀧真人、藤浪祐一郎、清水大輔、横井 勇人、鈴木 徹、Ocular-side lateralization of adult-type chromatophore precursors: Development of pigment asymmetry in metamorphosing flounder larvae, Journal of Experimental Zoology, Part B, Molecular and Developmental Evolution, 査読有、第 320B 巻、2013、151-165、[doi:10.1002/jez.b.22491](https://doi.org/10.1002/jez.b.22491)
- ②川崎和彦、鈴木 徹、Molecular evolution of matrix metalloproteinase 20、European Journal of Oral Sciences, 査読有、第 119 巻、2011、247-253、[doi:10.1111/j.1600-0722.2011.00898.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00898.x)
- ③松田陽平、伊藤淑恵、横井 勇人、橋本寿史、鈴木 徹、Detection of vitellogenin incorporation into zebrafish oocytes by FITC、Reproductive Biology and Endocrinology, 査読有、9 巻、2011、e45、[doi:10.1186/1477-7827-9-45](https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-45)
- ④伊藤淑恵、松田陽平、鈴木 徹、Effects of 3,4-dichloroaniline on expression of *ahr2* and *cyp1a1* in zebrafish adults and embryos, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Toxicology & Pharmacology, 査読有、152 巻、2010、189-194、[doi:10.1016/j.cbpc.2010.04.002](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.04.002)

[学会発表] (計8件)

- ①加藤寛之、横田真平、宇治督、横井 勇人、鈴木 徹、oct4-gfp Tg ゼブラフィッシュに由来する胚細胞の培養、平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 27 日、東京海洋大学
- ②加藤寛之、阿部光太、宇治督、橋本寿史、横井 勇人、鈴木 徹、Oct4-promoter/gfp-Tg ゼブラフィッシュとメダカを使った多能性のモニター、平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 27 日、東京海洋大学
- ③足立知子、関良子、猿渡悦子、日比正彦、鈴木 徹、橋本寿史、メダカの器官再生における *oct3/4* 陽性細胞の可視化、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜
- ④阿部光太、横井 勇人、鈴木 徹、第 44 日本発生生物学会、多能性をモニターする *oct4* promoter (トラフグ由来) -GFP トランスジェニックゼブラフィッシュの作出、2011 年 5 月

19 日、沖縄コンベンションセンター

[図書] (計1件)

- ①鈴木 徹、尾定誠、見てわかる農学シリーズ 4. バイオテクノロジー概論、第 5 章 水産におけるバイオテクノロジー、2012、pp. 81-94、朝倉書店

[その他]

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bioinfor/index-j.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 徹 (SUZUKI TOHRU)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：70344330

##### (2) 研究分担者

宇治 督 (UJI SUSUMU)  
独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所・研究員  
研究者番号：40372049

横井 勇人 (YOKOI HAYATO)  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：40569729