

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 25 日現在

機関番号：14401
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2016
課題番号：15K14897
研究課題名(和文) ミジンコを用いた有用タンパク質産生系の確立

研究課題名(英文) Protein production using *Daphnia magna*

研究代表者

渡辺 肇 (Watanabe, Hajime)

大阪大学・工学研究科 ・教授

研究者番号：80212322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではミジンコにおいて細胞外への分泌に必要なシグナルペプチド、および卵に取り込むのに必要なシグナルペプチドを同定し、これらのシグナルを融合させたGFP(緑色蛍光タンパク質)をミジンコ内で合成させた。まず細胞内で合成されたタンパク質をヘモリンフ中に分泌するために必要なシグナルペプチドを同定し、実際にこのシグナルペプチドを融合させたGFPタンパク質がヘモリンフ中に分泌されることを確認した。さらに卵中に取り込むのに必要なシグナルペプチドを同定し、この遺伝子断片を融合させたGFPタンパク質がミジンコの卵に取り込まれることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to produce artificial protein in *Daphnia magna* using genome editing technique. Firstly we made a synthetic gene that has a signal peptide necessary for secretion with green fluorescent protein (GFP) and confirmed that the product of the synthetic gene was secreted into hemolymph. Secondly we fused a gene fragment responsible for incorporation into eggs with the synthetic gene. This gene product was successfully synthesized in somatic cells and transported to eggs.

研究分野：環境生物学

キーワード：ミジンコ タンパク質産生 ゲノム編集 ビテロジェニン 細胞間輸送 シグナルペプチド

1. 研究開始当初の背景

抗体やワクチンを始めとする様々な機能性タンパク質のニーズが高まっているが、通常は CHO などの培養細胞を用いた系が主流であり、生産の手間とコスト、さらに血清を用いる場合にはそのリスクも問題となっている。一方でバクテリア、カイコ、ニワトリや植物に目的タンパク質を産生させる試みも進められているが、バクテリアでは分子量の大きなタンパク質の産生に問題があり、その他の生物種では手間と時間がかかるのが問題となっている。本研究では、最近我々が世界に先駆けて成功したミジンコの遺伝子操作技術を用いて、ミジンコにおいて有用タンパク質を産生させる。ミジンコは単為生殖をすることから、短時間で増殖可能であり、連続的に培養をしているだけで大量の卵を得ることができる。ミジンコは最近まで遺伝子操作が不可能であったが、我々は遺伝子の導入(1)および遺伝子の欠失(2)に成功し、さらに相同組換えによる遺伝子操作にも成功したところである(投稿準備中)。ミジンコの利便性とあわせて、遺伝子操作技術を確立したことで、まさにミジンコをツールとして使える期が熟したと言える。

2. 研究の目的

本研究では、まずミジンコのピテロジェニン遺伝子から、細胞外分泌に關与するシグナルペプチド領域を予測し、緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子に融合させる。この融合遺伝子をミジンコに導入し、実際にヘモリンフへの分泌を確認し、シグナルペプチドの同定を行い、分泌型 GFP 融合遺伝子を作製する。次にミジンコのピテロジェニン遺伝子から、ピ

テロジェニン受容体結合領域を予測し、分泌型 GFP 融合遺伝子に融合させピテロジェニン受容体結合分泌型 GFP 融合遺伝子を作製する。この遺伝子産物が実際に、ピテロジェニン受容体を介してミジンコの卵内に蓄積されることを確認する。将来的には、遺伝子発現誘導により、ピテロジェニンから目的タンパク質産生へ合成系をスイッチする系を確立しタンパク質産生系の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1)ミジンコのゲノム配列を申請者が属しているコンソーシアムのデータベースから入手し、ミジンコの全てのピテロジェニン遺伝子配列を明らかにする。(2)これらの配列を既知の生物種のピテロジェニン遺伝子と比較し、細胞外分泌に必要なシグナルペプチド領域、卵内へのエンドサイトーシスに必要なシグナルペプチド領域を推定する。(3)細胞外分泌に必要なシグナルペプチド領域を GFP に融合させた遺伝子を作製し、ミジンコで発現させ、必要十分なシグナルペプチドを決定する。(4)この分泌型 GFP にさらにエンドサイトーシスに必要なシグナルペプチドを融合させた遺伝子を作製する。(5)この2つのシグナルペプチドを有する GFP 遺伝子をミジンコで発現させ卵内への輸送を確認し、細胞間輸送に必要な十分なシグナルペプチドを決定する。必要に応じて強力なプロモーターを利用し、効率的に卵内に GFP を蓄積できる系を確立する。ピテロジェニン(VTG)は卵黄蛋白質の前駆体であり、脂肪体で合成され細胞外へ出た後にヘモリンフを介して卵巣に輸送され、ピテロジェニン受容体を介して卵内に取り込まれプロセシングをうけ蓄えられる。この VTG を緑色蛍光

蛋白質 (GFP) に置き換えるために下記の計画で実験を行う。

4. 研究成果

(1) ミジンコのゲノムデータベースから通常複数存在するピテロジェニン遺伝子配列を取得した。2つのピテロジェニン遺伝子については、すでに報告があることから、これらの配列を元にミジンコのゲノムをサーベイすることにより、全てのピテロジェニン遺伝子の配列を明らかにした。

(2) ミジンコのピテロジェニン遺伝子配列に加え、ショウジョウバエ、センチウをはじめとするピテロジェニン遺伝子の配列のアライメントを行い、保存されている領域を明らかにした。これらの保存領域を中心として細胞外分泌、およびピテロジェニン受容体依存的なエンドサイトーシスに必要なシグナルペプチドを推定した。細胞外分泌シグナルペプチドの探索には、別の生物種における分泌タンパク質に特徴的な配列を参考にした。

(3) 我々はすでに幼若ホルモン受容体に応答する DNA 配列を有するプロモーターが、ミジンコの脂肪体特異的な発現することを見出している。卵巣以外でタンパク質を発現させるために、この幼若ホルモン応答性のプロモーターを用いて、その下流に分泌シグナルペプチドと GFP を融合させた遺伝子を作製した。

(4) まずプラスミド DNA を一過的に卵に導入し、成長させ融合遺伝子産物の局在を蛍光顕微鏡で観察した。並行してマイクロキャピラリーを用いてヘモリンフを採取し、蛍光の測定およびウエスタン法などで、実際にヘ

モリンフ中に分泌される融合タンパク質を確認、定量する予定であったが絶対量が不足していたために、蛍光による観察にとどめた。

(5) この融合させた合成遺伝子が安定的に遺伝するトランスジェニックミジンコを作製した。特に(4)の解析において、絶対量が不足していたために、トランスジェニックミジンコを大量に培養し、ヘモリンフなどを一定量確保することで解析を行うことを目指した。

(6) 候補の分泌シグナルペプチドを必要に応じてトリミングし、GFP と融合させた分泌型 GFP 融合遺伝子を発現させその分泌効率を最大化する最小領域を決定する。

(7) (2)により明らかにしたピテロジェニン受容体遺伝子をもとに、他の生物種のピテロジェニン受容体遺伝子との比較を行った。特にリガンド結合反復(Ligand Binding Repeat: LBR)構造はピテロジェニンの取り込みに重要なドメインと考えられており、ピテロジェニンにおける受容体依存形エンドサイトーシスのシグナルを明らかにするための重要な知見となる。

(8) 種々のピテロジェニンのアミノ酸配列比較から生物種を超えて保存されているドメインを明らかにし、ピテロジェニン受容体と相互作用する可能性のある領域を抽出した。特にピテロジェニン受容体遺伝子において類似性が高い生物種の配列に重点を置くことにより、ピテロジェニン受容体結合シグナルの候補のリストアップを行った。

(9) (3)において作製した「分泌型 GFP 融合遺伝子」にさらに(2)で選択したピテロジェニン受容体と相互作用するドメインを融合させた。今までにティラピアおよび淡

水産のエビなどにおいて、ピテロジェニン受容体と相互作用する領域が報告されている。これらの報告を参考にして、対応する領域をミジンコから選択した。

(4) 作製したピテロジェニン受容体結合分泌型 GFP 融合遺伝子をミジンコ卵に顕微注入し、その発現を確認した。一過的な解析においては、融合遺伝子を注入後、約 1 週間培養をつづけ、育房に産み付けられた卵を回収し、蛍光顕微鏡でマーカーとしている GFP タンパク質の卵への蓄積を確認した。

(5) さらにこの融合遺伝子産物を確認するために、融合遺伝子をゲノムに組込んだトランスジェニックミジンコを作製した。この系統を一定数まで増やした後に卵を回収し、目的の GFP タンパク質が輸送、蓄積されていることを蛍光顕微鏡により確認し、その効率を評価するとともに、世代を超えて安定してタンパク質が産生されることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Uyeda, A., Nakayama, S., Kato, Y., Watanabe, H. and Matsuura, T. (2016) Construction of an in Vitro Gene Screening System of the E. coli EmrE Transporter Using Liposome Display.

Anal. Chem. 88, 12028-12035.

DOI: 10.1021/acs.analchem.6b02308

2. Ohta, N., Kato, Y., Watanabe, H., Mori, H. and Matsuura, T. (2016)

In vitro membrane protein synthesis inside Sec translocon-reconstituted

cell-sized liposomes.

Sci. Rep. 6, 36466.

DOI: 10.1038/srep36466

3. Nakanishi, T., Kato, Y., Matsuura, T. and Watanabe, H. (2016)

TALEN-mediated knock-in via non-homologous end joining in the crustacean *Daphnia magna*.

Sci. Rep. 6, 36252.

DOI:10.1038/srep36252

4. Mohamad Ishak, N. S., Kato, Y., Matsuura, T. and Watanabe, H. (2016)

Sequence Conservation and Sexually Dimorphic Expression of the Ftz-F1 Gene in the Crustacean *Daphnia magna*.

PLoS One. 11, e0154636.

DOI: 10.1371/journal.pone.0154636

〔学会発表〕(計 9 件)

中西 貴士, 荒尾 拓斗, 山口 修平, 加藤 泰彦, 渡邊 肇 「環境指標生物の毒性影響可視化のための遺伝子工学的手法の開発」第 43 回日本毒性学会学術年会 2016/06/28 ~ 2016/07/01 ウィンクあいち (愛知県名古屋市)

1. 加藤泰彦 渡邊肇 A long noncoding RNA regulates an environmental sex-determining gene doublesex1 in *Daphnia* RNA20162016/06/29 ~ 2016/07/02 国立京都国際会館 (京都府京都市)

2. 辻勇祐, 加藤泰彦, 渡邊肇 オオミジンコにおける組換えタンパク質の卵への輸送系の確立 第 68 回日本生物工学会 2016/09/28 ~ 2016/09/30 富山国際会議場 (富山県富山市)

3. 熊谷 仁志, 加藤 泰彦, 松浦 友亮, 渡邊 肇 ミジンコにおける 2A ペプチドを用いたバイシストロニック発現システムの構築 第 68 回日本生物工学会 2016/09/28 ~ 2016/09/30 富山国際会議場 (富山県富山市)

4. Hajime Watanabe Longevity lesson from freshwater crustaceans The 5th Beneficial Microbes Conference 2016/10/08 ~ 2016/10/14 アムステルダム (オランダ)

5. Hajime Watanabe, Quan D. Nong, Nur Syafiqah Mohamad Ishak, Yasuhiko Kato Male production mechanism in parthenogenetic crustacean, Daphnia Magna The 22nd International Congress of Zoology 2016/11/14~11/19 沖縄科学技術大学院大学 (沖縄県国頭郡)

6. Yasuhiko Kato, Syafiqah Ishak, Nong Dang Quang, Hajime Watanabe Function and regulation of Doublesex gene in the cyclical parthenogen Daphnia magna The 22nd International Congress of Zoology 2016/11/14~11/19 沖縄科学技術大学院大学 (沖縄県国頭郡)

7. 加藤泰彦, Nong Dang Quang, 渡邊肇 ミジンコの性決定遺伝子を活性化する長鎖ノンコーディング RNA の機能解析 第 39 回日本分子生物学会年会 2016/11/29~12/2 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

8. Nur Syafiqah Mohamad Ishak, Quang D. Nong, Yasuhiko Kato, Hajime Watanabe The bZIP transcription factor Vrille up-regulates the environmental sex-determining gene Doublesex1 in

Daphnia magna 第 39 回日本分子生物学会年会 2016/11/29~12/2 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

9. Quang D. Nong, Yasuhiko Kato, Hajime Watanabe TALEN-mediated knock-in of a reporter gene for visualizing expression of the sex-determining gene dsx1 in Daphnia magna 第 39 回日本分子生物学会年会 2016/11/29~12/2 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[その他]

ホームページ

<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/ez/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 肇 (WATANABE Hajime)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号 : 80212322