

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 元年 9 月 6 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07861

研究課題名(和文) 蛋白とエピジェネシスから見た遺伝形質の安定性に関する研究

研究課題名(英文) Studies of genetic stability on GH transgenic Amago salmon using protein expression and epigenesis

研究代表者

名古屋 博之(NAGOYA, Hiroyuki)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・主幹研究員

研究者番号：40372031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：成長ホルモン遺伝子を導入した遺伝子組換え魚が北米で申請され、承認された。しかし、遺伝子組換え魚の体内で起こる代謝の変化等はあまり調べられていない。そこで、成長ホルモン遺伝子を導入した遺伝子組換えアマゴの肝臓を用いて蛋白質変化を網羅的に解析した。その結果、非組換え魚と比較して1.5倍以上増加している蛋白質の存在と減少している蛋白質も確認した。代謝の変化では体サイズの増加やミトコンドリアの変化を確認した。さらに、遺伝子の機能を変化させるヒストンのメチル化を調べた結果、組換え魚でメチル化が高いことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高成長を目的とした遺伝子組換え魚は世界中で作出され、カナダの民間会社が成長ホルモン遺伝子を組み込んだ大西洋サケを食品として申請し、アメリカ及びカナダで安全性が確認され、市販が認められた。しかし、プロモーターの種類、導入遺伝子のコピー数や挿入領域により、遺伝子組換え魚の体内で起こる代謝の変化等は個々の条件より違っていると思われる。これらの情報に関してはあまり調べられていない。また、継代することによって導入形質の発現の変化に対する研究も少ない。したがって、これらの組換え魚に関する情報や知見を明らかにすることは、今後の遺伝子組み換え生物の利用に対する安全性の知見を提供する上で意義がある。

研究成果の概要(英文)：GH transgenic amago salmon was generated by injecting the OnMTGH1 gene. We generated Heterozygous (Tg/+) GH transgenic and Homozygous (Tg/Tg) GH transgenic amago salmon. We have studied GH transgenic amago salmon using iTRAQ-based proteomics, analysis of transcription and signal transduction based on the transcriptome, and further we examined modification using histone from fish. These data indicated that the most increased protein in the liver tissue from Homozygous was Cytochrome P450 1A3, and amount of Δ^6 desaturase protein was decreased to 0.3 times compare to that of control. The pathway analysis using these protein expression data showed the most variable molecular type was relating to chemical compound (43%), the next value being the kind of transcription regulator (16%). The result of histone modification was analyzed using purified histone from Homozygous and controlled fish, and showed that the number of methylation site was three times greater than that of control.

研究分野：魚類育種

キーワード：遺伝子組換え魚 安全性 蛋白質変化 エネルギー代謝 iTRAQ シグナル伝達 ヒストンメチル化

1. 研究開始当初の背景

地球規模の人口の増加に伴う動物タンパク原の需要を踏まえ、様々な国で高成長の遺伝子組換えの実用化に向けての研究が進んでいる。米国では高成長の遺伝子組換え大西洋サケがFDAに市販化申請され、すでに仮承認されている。中国では同様の高成長の遺伝子組換えコイが、韓国では遺伝子組換えドジョウが、キューバやイギリスでは同様の遺伝子組換えティラピアの研究が進んでいる。これらの食用の遺伝子組換え魚が市販化されるようになれば、TPP等が締結されれば我が国でも市販化申請される可能性も考えられる。この様な状況を想定して、高成長の遺伝子組換え魚についての情報を蓄積しておく必要がある。

2. 研究の目的

優良形質を次世代に伝える事は育種の重要な課題である。しかし、優良形質を持った魚を何世代にも渡り掛け合わせるとその形質が失われることがよくある。これは染色体の組換え影響やエピジェネティクス(DNA塩基配列の変化を伴わない後天的な遺伝子制御の変化)が原因と考えられている。我々は成長ホルモン(GH)遺伝子組換えアマゴを7世代に渡り飼育してきた。1世代目は極端な卵の死亡率を示したが、著しい高成長を示した。しかし、その形質が近年変化し、卵の死亡率は低下したが、今迄の様な高成長を示さない個体も出現するようになった。驚くことに、GH遺伝子組換えアマゴはヒストンのメチル化はコントロールに比べ3倍以上も高いことが判っている。そこで、GH遺伝子組換えアマゴを長期飼育生物のモデルとして用いて①更に継代を続け、成長差を調べる。②ヒストン蛋白のレベルで、どれだけエピジェネティックな違いがあるのかを過去のサンプルとの比較により明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 新規のGH遺伝子組換えアマゴを作成

すでに飼育しているGH組換えアマゴを作成するのに用いたOnMTGH1プラスミッドをテンプレートにし、T3及びT7プライマーを用いてメタロチオネインプロモーターとGH遺伝子の配列部分を増幅し、これを精製後、導入遺伝子とした。これを0.04%プリリアントブルーFCF含むリバーPBSに溶かし、受精卵の卵門にマイクロインジェクションした。コントロールとして受精卵に0.04%プリリアントブルーFCF含むリバーPBSをマイクロインジェクションした。ふ化した個体は成長のよい個体順にPCRによって導入遺伝子を確認した。導入遺伝子を確認にはプロモーター上の配列とGHのイントロン領域で設計したプライマー(MtBPro及びOnInC)を用いた。また、マイクロインジェクションした個体の体の一部から得られたDNAで確認されなかった個体も、そのまま飼育を続け、次世代をとる親魚とした。得られたF1で高成長を示した個体のDNAを前述のプライマーを用いて導入遺伝子の有無の確認を行った。

(2) TRAQ法を用いたプロテオミクス解析

コントロールとGH遺伝子組換えアマゴホモ肝臓に10 μ L/mLのProtease inhibitor (ITSI bio science)が入ったRIPA buffer (1M Tris HCl, 5M NaCl, 10% SDS, 10% Trion X-100)を加えて可溶タンパク質を抽出した。タンパク質濃度を濃縮するため、アセトン沈殿を行った。タンパク質濃度測定はBCA Protein Assay kit (Pierce, Thermo USA)を用いて行った。次に得られたタンパク質に、iTRAQ Labelingを行った。濃度補正をしたタンパク質抽出液(2.5 μ g/ μ L)をトリプシン消化(Promega, USA)した後、それぞれのペプチド溶液をiTRAQ Reagent 4plex (AB Sciex USA)を用いてラベリング(114・117=コントロール/115・116=ホモ)を行った。その後タグ付けしたペプチド溶液をまとめ、SpeedVacにより濃縮乾固させた。次に、このサンプルを用いてHPLC fractioning and desaltingをおこなった。微量ペプチドの検出を可能にするため、濃縮乾固させた混合サンプルを強陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて分画した。カラムクロマトグラフィーはSolvent A(50mM K₂P₄O₇, 25%Acetonitrile (ACN), pH2.6)で再溶解(200 μ L)させ、HPLC (LC20AD, SHIMADU, Japan)のSCXカラム (Phenomenex, Luna®, 5 μ L SCX 100Å)によってフラクショネーションした。その後、各分画をSpeedVacによって濃縮乾固させ、Sample Buffer(20%ACN, 2%トリフルオロ酢酸(TFA))で再溶解させた。再溶解させたサンプルをC18 column (pep Clean™ C18 Spin Columns #89870)を用いて脱塩した。脱塩させたサンプルは70% ACNで溶出させ、溶出液をSpeedVacで再度濃縮乾固させた。LC-MS/MS analysisは以下の様に行った。濃縮乾固させたサンプルをSolvent B(2% ACN and 0.1% HCOOH)で再溶解(100 μ L)させ、サンプル溶液をLC: Easy nLC1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)によって解析した。LC/MS/MSによって得られたデータをThermo Scientific™

Proteome Discoverer™ 1.4 software (Thermo scientific)によってタンパク質の同定、定量解析を行った。また、タンパク質のIdentification and QuantificationはLCMS/MSのスペクトラムデータをThermo Scientific™ Proteome Discoverer™ 1.4 softwareで行った。更にタンパク質の同定・定量を行ったデータを基に、GH遺伝子組換えアマゴホモ肝臓はどのような変化が起きているのかをIngenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェア (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com)を用いて解析した。IPA解析を行うために、タンパク質同定データをブラストから、ヒトデータベースに当てはめ直し、変化のある代謝経路の模索を行った。

(3) 遺伝子組換えアマゴの肝臓で発現する遺伝子群のシグナルトランスダクションの解析

遺伝子組換えアマゴホモ、ヘテロ (メス由来) コントロール (Ageコントロール) の肝臓からmRNAを精製し、これを鋳型にしてイルミナ解析を行い、発現遺伝子の大規模シークエンスを行った。得られた発現遺伝子のシグナル伝達の解析をする為に、シグナルトランスダクションの解析が可能なゼブラフィッシュの遺伝子に当て直して、1.5倍の変化量を示した2163種類の遺伝子を得た。この遺伝子群の変化からシグナルトランスダクションの変化を調べた。

(4) ヒストン蛋白の修飾解析

遺伝子組換えアマゴホモとコントロール (Age コントロール) の肝臓を 10uL/mL の Protease inhibitor (ITSI bio science)が入った RIPA buffer (1M Tris HCl, 5M NaCl, 10% SDS, 10% Trion X-100)を加えて可溶タンパク質を抽出した。次に、このタンパク質をヒストン抽出カラムで精製した。この蛋白質を10%SDS Page で電気泳動した。この SDS Page のゲルからヒストン蛋白を3つに切り出して、それぞれトリプシン、エラスターゼ、キモトリプシンで処理した。その後、其々のゲルからタンパク質を抽出して Waters NanoAcquity HPLC に分離した。次に、その分離したタンパクを Orbitrap により MS/MS 解析した。その解析データを更に Mascot によるデータサーチを行った。

4. 研究成果

(1) 新規の GH 遺伝子組換えアマゴの作出

プロモーターと成長ホルモン遺伝子をつなげた配列をアマゴ受精卵 847 粒にマイクロインジェクションした。これらの受精卵のうち、61.5%で発生がすすみ、47.2%がふ化した。一方、継代しているベクター領域の挿入された遺伝子組換えアマゴを用いて3組の交配を行い、ふ化率は92.6、76.1、24.8%であり、非組換え魚を用いたふ化率と比較した結果、特に低いという結果では無かった。新たにマイクロインジェクションした個体の中で高成長を示した個体からゲノム DNA を抽出して、導入 DNA の有無を調べた結果、成長のよかった上位132個体の脂鱗 DNA からは導入 DNA は確認されなかった。また、成熟するまで成長した親魚のうち、雌29尾、雄19尾、雌雄不明1尾の全てから導入遺伝子は検出されなかった。これらの親魚から得られたF1においても、高成長を示した個体24尾を用いて導入遺伝子をPCRで確認したが、導入遺伝子は確認されなかった。

(2) iTRAQ 法を用いたプロテオミクス解析

iTRAQ 法とは網羅的タンパク質の定量解析が可能な方法である。この方法を利用して、GH 遺伝子組換えアマゴの著しい形態異常を示すホモ個体の肝臓におけるタンパク質変化を網羅的に解析した。プロテオミクス解析により292個のタンパク質が同定できた。そのうち、コントロールと比較してホモで1.5倍以上増加しているタンパク質は270個存在した。GH 遺伝子組換えアマゴホモ肝臓で最も増加していたタンパク質はコントロールの7.7倍であった。一方、最も減少していたタンパク質は脂質代謝関連遺伝子である Δ -6 desaturase でコントロールの0.3倍であった。 Δ -6 desaturase の減少は先行研究のイルミナ解析のデータ (Δ -6fatty acyl desaturase が0.096倍)を裏付けた。次に、タンパク質の同定結果を既存のヒトデータベースに当て直した結果、14個の魚特有と思われるタンパク質はヒトのデータベースに対応するIDを得ることができなかった。IPA解析により、タンパク質の分類を行ったところ、Molecular type で最も変化のあったのは化合物であり43%、次に高い値であったのが Transcription regulator の16%であった。上位10種類の代謝変化の内訳は、上位3つが筋肥大に関わる EIF2Signaling、eIF4/p70S6K signaling、mTOR signaling であり、GH 遺伝子組換えに伴う、体サイズの増大を示唆している。他の代謝経路で興味深い点はミトコンドリアの機能不全の可能性が高いことが示されたこと、エネルギー代謝関連(糖新生、解糖系、酸化リン酸化反応)が変化していることである。また、発現蛋白から病気・生理機能・分子や細胞の機能・毒性の4項目についてそれらとの関連性を網羅的に明らかにした。病気の項目では、ガン化、臓器損傷、腫瘍、神経的疾患等に関連する症状が高い割合で起きていることが示唆された。生理機能の項目では心機能、骨、筋肉の発達の可能性が示唆された。分子や細胞の機能の項目では Cell death and survival、Protein synthesis、Gene Expression cell cycle、RNA post-Transcriptional Modification が変化している可能性が高かった。毒性の項目では Aryl

Hydrocarbon Receptor Signaling, Renal Necrosis /Cell Death, Cardiac Hypertrophy, Cytochrome P450 Panel, Mitochondrial Dysfunction の変化が起きている可能性が高いことが明らかになった。IPA 解析の結果からエネルギー代謝変化が示唆されたため、真核生物の主な ATP 産生経路(好氣的代謝・嫌氣的代謝)について既存の代謝マップに当てはめた。解糖系では、10 種類の酵素のうち、4 種類の酵素が GH 組換えアマゴのホモ肝臓で 1.4 倍から 6.7 倍の増加を示した。次に、TCA 回路では、アセチル CoA からクエン酸を産生する酵素である Citrate synthase が 2.0 倍増加していた。最後に ATP 産生を主に行う、ミトコンドリアの電子伝達系は 5 つの呼吸鎖から構成される。この電子伝達系で 1.6~2.8 倍、GH 組換えアマゴホモ肝臓で増加した。

(3) 遺伝子組換えアマゴの肝臓で発現する遺伝子群のシグナルトランスダクションの解析

ヘテロ (メス由来) で一番変化しているシグナルトランスダクションは Unfolded protein response, NRF2-mediated Oxidative Stress Response, Sirtuin Signaling Pathway, Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling, Estrogen-Dependent Breast Cancer Signaling であった。また、ホモで発現しているシグナルトランスダクションは Unfolded protein response, NRF2-mediated Oxidative Stress Response, Estrogen-Dependent Breast Cancer Signaling, Aldosterone Signaling in Epithelial Cells, Phagosome Maturation が遺伝子組換えにより大きく変化している事が明らかになった。

(4) ヒストン蛋白の修飾解析

ヒストン H1, H2A, H2B, H3, H4 を検出することが出来、コントロールとホモのアミノ酸カパー率は其々全体の 79.4% と 82.6% であった。ヒストンの修飾は Meth1, di-Meth1, Acetyl, Oxidation, Carbamidomethyl, Acetaldehyde が検出された。そしてこれらの修飾はホモ個体とコントロールで著しく異なり、ホモ個体で Meth1 化は著しく高かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, X 線照射による遺伝子組換えアマゴの不妊化, 水産育種, 査読有, 48 巻 2 号, 2019, p117-123.

〔学会発表〕(計 1 件)

佐藤友彦・井上菜穂子・地家豊治・逸見明博・名古屋博之・森司. ミトコンドリアの機能から解析した成長ホルモン (GH) 遺伝子組換えアマゴのエネルギー代謝変化, 2018 年 日本水産学会

〔図書〕(計 1 件)

正岡哲治 (2019) クローズアップ サーモン養殖 ~産地・資材・疾病~, 海外における遺伝子組換え魚の市場化議論・規制の現状と日本への影響, 月刊養殖ビジネス, 3 月号, pp50-54, 緑書房, 東京

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 正岡哲治

ローマ字氏名: MASAOKA, Tetsuji

所属研究機関名: 国立研究開発法人水産研究・教育機構

部局名: 増養殖研究所

職名: 主任研究員

研究者番号 (8 桁): 70372042

研究分担者氏名: 森司

ローマ字氏名: MORI, Tukasa

所属研究機関名: 日本大学

部局名: 生物資源科学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 60241379

研究分担者氏名: 井上菜穂子

ローマ字氏名: INOUE, Naoko

所属研究機関名: 日本大学

部局名: 生物資源科学部

職名: 助教授

研究者番号 (8 桁): 00509515