

平成 30 年 4 月 13 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14984

研究課題名(和文) 魚卵をターゲットとした超効率・超集積型タンパク質発現系の開発

研究課題名(英文) Development of highly efficient and accumulated protein expression system targeted to fish eggs

研究代表者

田丸 浩 (Tamaru, Yutaka)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：50324554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュで機能的なCRISPR-Cas9システム用プラスミドの構築を目指した。すなわち、当研究室で開発したゼブラフィッシュ全身発現用プロモーター zef1alphaを用いてCas9タンパク質を発現し、一方でゼブラフィッシュ由来U6プロモーターを用いてguide RNA (gRNA)の発現を行った。構築したプラスミドをインジェクションした24hpf胚において、Cas9遺伝子の下流に位置する蛍光タンパク質(EGFP)の発現を確認するとともに、Cas9タンパク質の発現も確認した。一方、U6プロモーターによってビトロジェニン1(Vtg1)遺伝子で設計したgRNAの発現にも成功した。

研究成果の概要(英文)：We attempted to construct a functional plasmid for CRISPR-Cas9 system in zebrafish. While the EF-1 alpha (zef1alpha) promoter from zebrafish developed by our laboratory was used for Cas9 protein expression, the U6 promoter newly cloned from zebrafish was used for the expression of guide RNA (gRNA). After an injection to fertilized eggs from zebrafish with the constructed plasmid, both EGFP expression downstream of Cas9 gene in the plasmid and Cas9 protein expression were observed among zebrafish 24 hours-per-fertilization (hpf) embryos. Furthermore, gRNAs designed by the vitellogenin gene in zebrafish genome were successfully expressed.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：ゲノム編集技術 ゼブラフィッシュ Crispr-Cas9

1. 研究開始当初の背景

魚卵は鳥類や爬虫類のように、卵黄がその大部分を占めている。さらに、卵黄中のタンパク質はメスの肝臓で生産され、卵巣の細胞を通過して卵黄中に高濃度に蓄積されており、そのタンパク質量は魚種によって異なるが、卵1個当たり数十～数百μg程度にもなる。このように、卵黄タンパク質の高い生産量と局所への高度な蓄積という特徴は、標的タンパク質の大量調製や精製といった目的に非常に好都合であると考えた。そこで、卵黄タンパク質と同じ振る舞いをするように外来タンパク質の発現と蓄積を制御できる発現ベクター系を開発することができれば、組換えタンパク質大量発現系の構築が可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、魚類モデルであるゼブラフィッシュにおいて最も生産性が高いと考えられる魚卵をターゲットとしたタンパク質生産系の構築を実現する。すなわち、標的タンパク質の高発現と発現タンパク質の卵黄への蓄積を実現するベクター系を開発し、このベクター系をゲノム編集技術を用いてトランスジェニックフィッシュを作製することで、標的タンパク質の卵黄への高濃度な蓄積と得られた組換えタンパク質の有用性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、魚類モデルとして広く利用されているゼブラフィッシュを用いて、その主要な卵黄タンパク質で発現量が非常に多いピテロジェニン1 (Vtg1) に着目し、その遺伝子プロモーターならびにタンパク質発現効率に関連すると思われる mRNA の 5'UTR 領域の解析、卵黄への蓄積に関与するタンパク質ドメインの同定を行い、これらの結果をもとに目的タンパク質の高発現と卵黄への蓄積を可能にするベクターシステムを構築する。

4. 研究成果

ゲノム編集機能を装備したベクターシステムとして、guide RNA (gRNA) 発現用プロモーターとして、ゼブラフィッシュ由来 U6 プロモーターをゲノム DNA からクローニングした。また、Cas9 遺伝子の発現には研究室所有のゼブラフィッシュ由来 EF-1 (zef1alpha:pZef) プロモーターを用いた。さらに、マイクロインジェクション後の遺伝子発現を確認するために、Cas9 タンパク質の下流に 2A ペプチドコード領域を挟んで蛍光タンパク質(EGFP)遺伝子を配置した(図1)。また、今回標的とした Vtg1 遺伝子内の 3 箇所(図2)のゲノム領域に sgRNA を設計した(図2)。構築したゲノム編集用ベクターをインジェ

クション後、EGFP の発現が確認された 24hpf 胚において、3 箇所の gRNA は U6 プロモーターの存在下でそれぞれ発現していた(図3)。一方、ウェスタンブロットの結果から、およそ 150kDa の位置に Cas9 タンパク質が確認された(図4)。

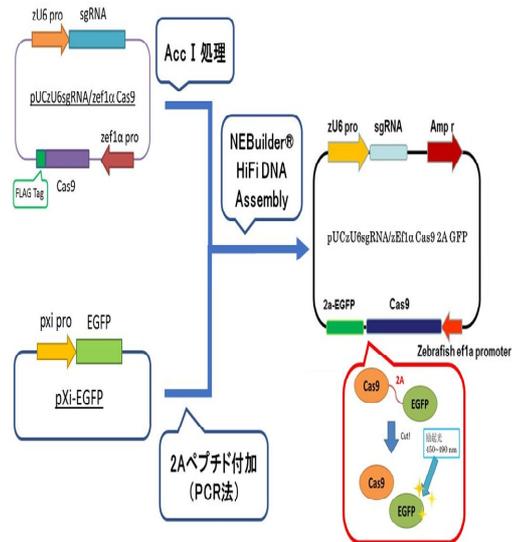


図1. 構築したゲノム編集用プラスミドの概略

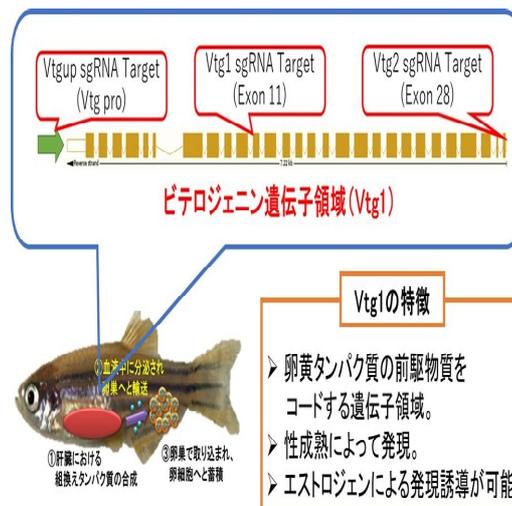


図2. gRNA 設計に用いたピテロジェニン (Vtg1) 遺伝子領域

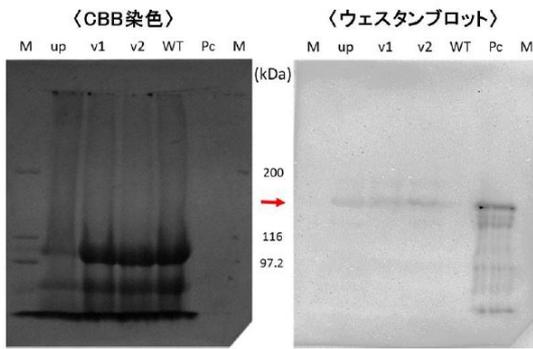


図3. ゼブラフィッシュ初期胚 (24hpf) における Cas9 遺伝子および Vtg1 gRNA の検出

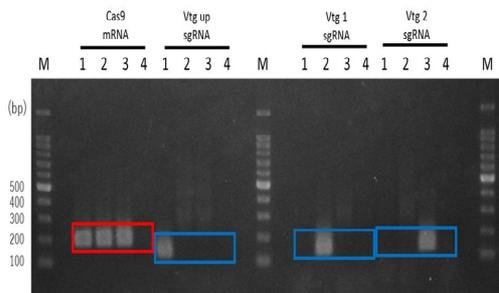


図4. ゼブラフィッシュ初期胚 (24hpf) における Cas9 タンパク質の検出

以上の結果、当初の目的通りのゲノム編集用ベクターを構築することができた。次に、Vtg1 遺伝子内の3箇所のゲノム領域においてゲノム編集が起こったかどうかをサンガー法による塩基配列解析を行ったところ、1塩基置換は確認されたが塩基の欠失や挿入は確認されなかった。以上の結果から、今後は Cas9 タンパク質の発現時期や合成量、その活性について検討する予定である。

最後に、ゼブラフィッシュにおける Rosa26 様ゲノム領域の検索を行った。その結果、ノンコーディング RNA をコードする候補領域を見つけることができた(図5)。今後は、この Rosa26 様ゲノム領域に標的遺伝子をゲノム編集することで、さまざまな臓器・組織から標的遺伝子産物を定量することで標的タンパク質の増産につなげたい。

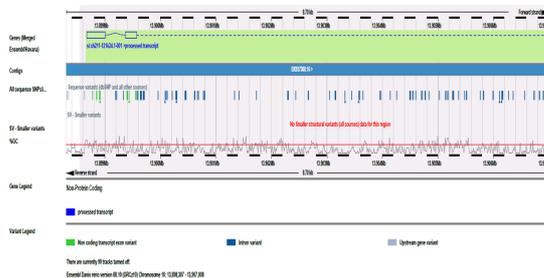


図5. ゼブラフィッシュゲノムにおける Rosa26 様の領域

## 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 0 件)

### 【学会発表】(計 5 件)

1. 滝藤 正都, 西村 溪, 田丸 浩. ゼブラフィッシュ用ゲノム編集プラスミドベクターの構築. 第81回日本生化学会中部支部例会, 名古屋市立大学(名古屋市), 2017年5月20日.

2. 滝藤 正都, 西村 溪, 中谷 肇, 堀 克敏, 田丸 浩. ゼブラフィッシュ用ゲノム編集プラスミドベクターの構築. 日本ゲノム編集学会第2回大会, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市), 2017年06月29日.

3. 西村 溪, 中谷 肇, ヴィシャル-坂 恵利子, 堀 克敏, 田丸 浩. ゼブラフィッシュを用いたゲノム編集用プラスミドの構築. 日本ゲノム編集学会第1回大会, 広島国際会議場(広島県・広島市), 2016年09月06日.

4. 西村 溪, 中谷 肇, ヴィシャル-坂 恵利子, 堀 克敏, 田丸 浩. ゼブラフィッシュを用いたゲノム編集プラスミドの構築. 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2016年12月02日.

5. Kei Nishimura, Hajime Nakatani, Eriko Avsar-Ban, Katsutoshi Hori, Yutaka Tamaru. Construction of the plasmid for genome editing using zebrafish. iBioP 2016 (国際学会), Haeundae Grand Hotel (韓国・プサン市), 2016年12月16日.

### 【図書】(計 0 件)

### 【産業財産権】

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ

6．研究組織

(1)研究代表者

田丸 浩 (Tamaru, Yutaka)  
三重大学・生物資源学研究科・教授  
研究者番号：50324554

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

中谷 肇 (Nakatani, Hajime)  
名古屋大学・工学研究科・講師  
堀 克敏 (Hori, Katsutoshi)  
名古屋大学・工学研究科・教授