

令和 4 年 9 月 6 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21273

研究課題名(和文)光合成ゼブラフィッシュの構築

研究課題名(英文)Construction of photosynthetic zebrafish

研究代表者

島田 康人(Shimada, Yasuhito)

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：40378427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：サンショウウオの1種が受精卵時に近接する藻類を体内に取り込み、生育後も共生する藻類が光合成を行うことによりエネルギーをサンショウウオ本体に提供している。このサンショウウオと同様のことが人工的に可能か、ゼブラフィッシュ受精卵を用いて検討した。まず、細胞内ATP量に応じて蛍光を変化させるFRETタンパク質ATeamを恒常発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュを構築した。特定のシアノバクテリアをATeamゼブラフィッシュに血管内移植した結果、体内ATP量の増加が1週間にわたって検出できた。また、さらなる長期の共生モデルとして、腸内細菌叢としてのシアノバクテリアの定着に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物体内における光合成の成立は、前述のサンショウウオ以外これまで報告がなく、また人工的に行われたものもない。全く新しいチャレンジング(挑戦的)な研究である。将来的な応用展開としては、例えば腸内細菌としてのシアノバクテリアの共生による動物個体への栄養補給、特に飢餓・低栄養環境下での栄養補給や、魚類や哺乳類動物の養殖のサポートなどを想定している。

研究成果の概要(英文)：One species of salamander takes in neighboring algae at the time of fertilization of eggs, and the symbiotic algae provide energy to the salamander itself through photosynthesis after growth. We investigated whether it is possible to do the same thing artificially using fertilized zebrafish eggs. First, we constructed a genetically modified zebrafish that constantly expresses the FRET protein ATeam, which changes its fluorescence in response to the amount of intracellular ATP. Intravascular transplantation of specific cyanobacteria into the ATeam zebrafish resulted in a detectable increase in the amount of ATP in the body for one week. As a further long-term symbiosis model, cyanobacteria were successfully established as intestinal microflora.

研究分野：生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 光合成

1. 研究開始当初の背景

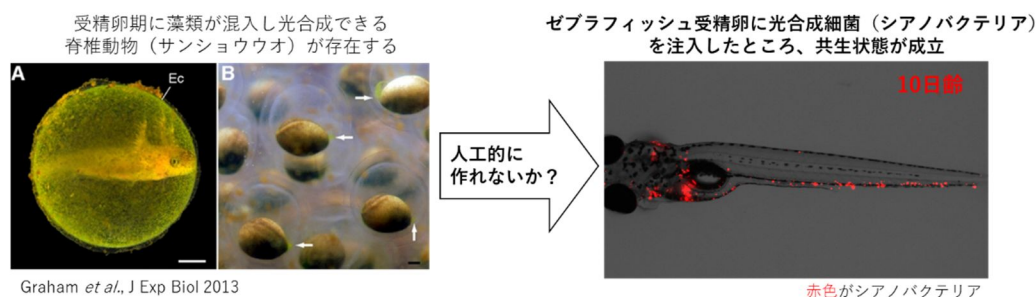
植物細胞の主要なエネルギー(ATP)合成器官である葉緑体を動物個体・細胞内に導入し、その生体活動を補助させるというアイデアは一見突拍子もないものに見えるが、既に自然界では成立している。原生動物界ではミドリムシが体内の葉緑体で光合成しながら同時に捕食活動を行い、無脊椎動物界では一部の軟体動物(ウミウシや有孔虫、繊毛虫など)が経口摂取した藻類由来の葉緑体を体内に保持し(盗葉緑体現象)光合成によるエネルギー補給を行っている。脊椎動物ではこういった現象は不可能と考えられてきたが、2013年にサンショウウオの1種(*Ambystoma maculatum*)が受精卵時に近接する藻類を体内に取り込み、生育後も共生する藻類が光合成を行うことによりエネルギーをサンショウウオ本体に提供していることが報告された(Graham *et al.*, *J Exp Biol* 2013;216:452-459)。

2. 研究の目的

申請者はこのサンショウウオと同様のことが人工的に可能か、ゼブラフィッシュ受精卵を用いて研究を行っている。光合成細菌であるシアノバクテリアを受精卵に注入した結果、一時的な共生状態を確認し(現在も飼育中)、前述のサンショウウオと同様の状態が起きていると考えられた(図1)。なおシアノバクテリアは元来、近赤外波長領域の蛍光を有しているため、生体イメージングで体内のどこに存在するか分かる。

本研究では、このシアノバクテリア共生ゼブラフィッシュ体内において、バクテリアが光合成によって産生するATPが、ゼブラフィッシュの成長・活動に貢献しているかを明らかにし、さらに長期の共生モデルを構築する。

図1 ゼブラフィッシュが光合成由来ATPを利用できているか?



3. 研究の方法

1. 改良型 ATeam 発現ゼブラフィッシュの作製

シアノバクテリアが産生するATPが、ゼブラフィッシュ細胞内に移行しているかを明らかにするため、細胞内ATP濃度センサータンパク質 ATeam を恒常発現するゼブラフィッシュを作製した。ATeam は FRET を利用した ATP センサータンパク質であり、周囲のATP量によって蛍光プロファイルが変わる(Imamura *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:15651-15656)。このタンパク質は37環境下で活性を持つが、今回はゼブラフィッシュ体内(28℃)でも活性を持つ様、改変したものを使用する。この改変型 ATeam 配列をアクチンのプロモーター配列下に結合し、メダカトランスポゾン *tol2* 系を用いたベクターに導入した。そしてゼブラフィッシュ受精卵へのマイクロインジェクションを行い、そのゲノム内に目的配列を挿入した。

2. シアノバクテリア共生ゼブラフィッシュ組織内ATPの評価

ATeam 発現ゼブラフィッシュ初期胚にシアノバクテリア(*Synechocystis sp.* PCC6803 および PCC6803-GT)を注入し、飼育する。成長の各段階で、共焦点蛍光顕微鏡を用いて体内の ATeam の蛍光変化を検討した。ATeam の FRET 観察には以下のフィルターを切り替えて撮影した。

フィルター1: 励起 438/24-25 蛍光 483/32-25

フィルター2: 励起 438/24-25 蛍光 542/27-25

ATP量はフィルター1とフィルター2で撮影した画像の比として算出し、ImageJソフトウェアの FRET and Colocalization Analyzer プラグイン(Hachet-Haas *et al.*, *Microsc Res Tech.* 2006;69:941-956)を用いた画像化した。蛍光量の数値化にあたっては、ImageJ上でFRET画像を単色化し、個体における総蛍光量を定量した(図2)。

図2 ATeam発現ゼブラフィッシュの画像解析



3. シアノバクテリア共生ゼブラフィッシュの改良

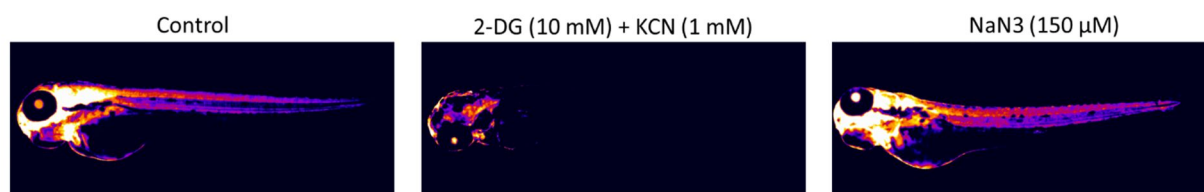
シアノバクテリアとゼブラフィッシュの共生期間の延長を目的として、成長のどの段階までこの共生が可能なのか、移植部位（卵黄嚢や血管内、腸管）・時期（受精卵期だけでなく、稚魚・成魚期）の変更によって共生期間の延長が可能なのか検討した。

4. 研究成果

1. 改良型 ATeam 発現ゼブラフィッシュの構築

改良型 ATeam 発現ゼブラフィッシュの F0 個体から F1 を調製し、蛍光顕微鏡下で全身に恒常的に GFP 波長蛍光を発現するゼブラフィッシュを回収した。まず、この個体において体内 ATP 量をモニタリングできているかどうか確認するため、ATeam を導入した培養細胞系ですでに報告 (Imamura *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:15651-15656) のある 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) とシアン化カリウム (KCN) としてミトコンドリアの活動を阻害し ATP 合成を阻害するアジ化ナトリウム (NaN₃) を曝露投与した。受精後 3 日目の ATeam 発現ゼブラフィッシュに 20 分間投与した。その結果、図 3 に示すように、2-DG と KCN を同時投与した個体では著明な ATP 量の減少を認められた (白い部分が高 ATP 領域)。なお、2-DG と KCN をそれぞれ単剤投与した個体では明らかな ATP 量の変化は認めなかったが、この結果は前述の細胞試験の結果と一致した。一方、NaN₃ は毒性発現が早く (すぐに死亡) 安全領域であった 150 μM では体内 ATP 量に影響は認められなかった。

図3 ATeam発現ゼブラフィッシュの評価



2. シアノバクテリア共生ゼブラフィッシュ体内 ATP の評価

培養したシアノバクテリアを受精後 48 時間の ATeam 発現ゼブラフィッシュに移植した。シアノバクテリアは近赤外領域の蛍光を発しているため、FRET による ATP モニタリングとシアノバクテリアを同時イメージングできる (図 4、緑色がシアノバクテリア)。使用したシアノバクテリアは、前述の *Synechocystis sp.* PCC6803 に加え、その亜種である *Synechocystis sp.* PCC6803-GT を用いた。移植後 3 日目、PCC6803 は PCC6803-GT に比べ、ゼブラフィッシュ体内における増殖が速く、増加傾向は 5 日目まで続いた。その後、体内のシアノバクテリアは減少し、2 週間ほどでほぼ消失した。シアノバクテリア量を定量したグラフを図 5 に示す。また、PCC6803 を移植した個体ではゼブラフィッシュ体内の ATP 量が増加しており、PCC6803 の光合成にて産生された ATP がゼブラフィッシュ体内に供給されていることが示唆された。なおこの作用は PCC6803-GT にはほとんど認められなかった。画像上の体内 ATP シグナルを定量し、グラフ化したものを図 6 に示す。

図4 ATerm発現ゼブラフィッシュ体内へのシアノバクテリア移植

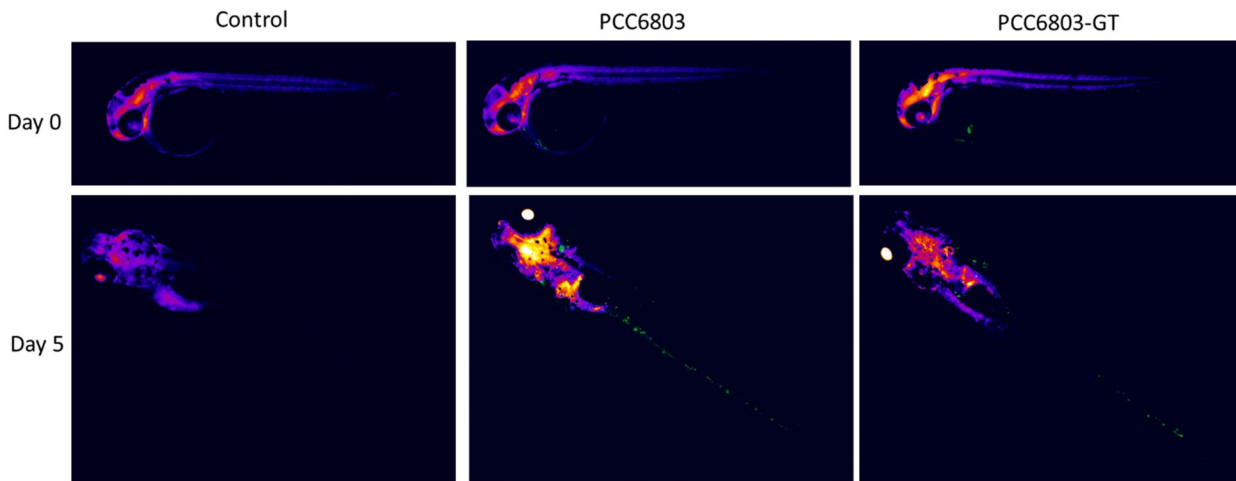


図5 ゼブラフィッシュ体内のシアノバクテリア量の変化

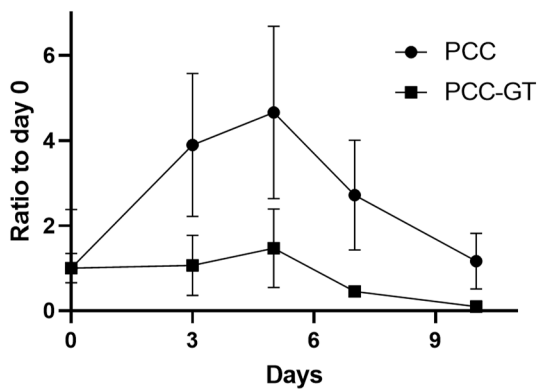
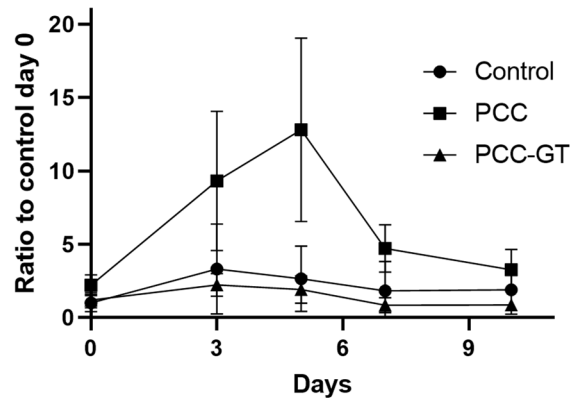


図6 ゼブラフィッシュ体内ATP量の変化

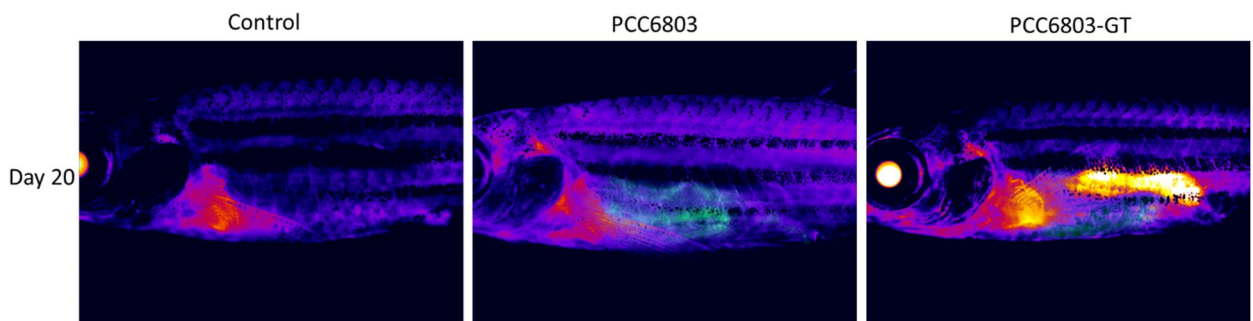


3. シアノバクテリア共生ゼブラフィッシュの改良

シアノバクテリア (*Synechocystis* sp. PCC6803) を移植したゼブラフィッシュ体内における量は、そのバクテリア量の変化と相関して移植後5日目をピークとして減少していく(図5)。そこでより長期のバクテリア定着を目指し、様々な成長段階および臓器への移植を検討した。その結果、シアノバクテリアをゼブラフィッシュに経口投与し、腸内細菌として生着させるのが最も長期にわたって共生できることが明らかとなった。

受精後2カ月齢のATeam発現ゼブラフィッシュに1週間、シアノバクテリア(PCC6803およびPCC6803-GT)を曝露投与し、その後20日間にわたってFRETによるATPイメージングを行った。その結果、投与終了後20日目でも腸内にシアノバクテリアの存在を確認できた。また体内ATP量は前述の血管内移植時と異なり、PCC6803-GTにおいて腸管付近において増加が認められ、PCC6803には認められなかった(図7)。

図7 腸内細菌としてのシアノバクテリア移植ゼブラフィッシュ



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	今村 博臣 (Imamura Hiromi) (20422545)	京都大学・生命科学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	中山 寛子 (Nakayama Hiroyuki) (20831085)	三重大学・地域イノベーション学研究所・研究員 (14101)	
研究分担者	加藤 浩 (Katoh Hiroshi) (30378327)	三重大学・地域イノベーション推進機構・助教 (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関