



2022年11月24日

報道機関 各位

東北大学大学院農学研究科

軟体動物で機能する強力なプロモーターの世界初の発見 －軟体動物の遺伝子を機能解析できる基盤技術に目処－

【発表のポイント】

- ・これまで見つかっていなかった、軟体動物で機能する強力なプロモーター^{※1}の同定に世界で初めて成功した。
- ・このプロモーターは二枚貝に感染するカキヘルペスウイルス1型^{※2}のDNA配列から単離され、0sHV-1プロモーターと命名された。
- ・本プロモーターを利用することで、二枚貝をはじめとする軟体動物において、外来遺伝子を導入した遺伝子組換え動物の作製や、過剰発現系を用いた遺伝子の機能解析が可能になると期待される。

【概要】

二枚貝をはじめとする水生無脊椎動物は、再生、適応、生殖、老化等において特筆すべき生物学的特徴を示し、その基盤となる遺伝子機能を解明することには高い学術的意義があります。これまでマウスやゼブラフィッシュ等のモデル動物における遺伝子の機能解析では、培養細胞や個体に研究対象となる標的遺伝子を導入し、過剰に発現させた表現型からその遺伝子機能を推定してきました（過剰発現系を用いた表現型解析）。この遺伝子の過剰発現には、プロモーターと呼ばれるDNA配列が不可欠です。しかし、水生無脊椎動物で十分に機能するものはこれまでありませんでした。この有効なプロモーターが無いことが技術的なボトルネックとなり、軟体動物における遺伝子の機能解析を妨げている状況にありました。

東北大学大学院 農学研究科 水圏動物生理学分野の Yoon Jeongwoong（ユンジョンウン）大学院生、横井勇人（よこい はやと）助教、尾定誠（おさだ まこと）教授、長澤一衛（ながさわ かずえ）助教のグループは、軟体動物で機能する強力なプロモーターを同定することに世界で初めて成功しました。

本研究グループは、カキヘルペスウイルス1型 (Ostreid herpesvirus 1, 0sHV-1) 由来の Poshv117 という DNA 配列が、二枚貝を含む様々な動物種の細胞で強力なプロモーター活性を示すことを発見し、0sHV-1 プロモーターと命名しました（図1参照）。

本成果は、2022年11月2日に国際科学誌 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) オンライン版で掲載されました。

本研究成果は主に、日本学術振興会 科学研究費補助金 基盤研究 C「貝類造血機構の解明を目指したシングルセル解析と遺伝子改変技術の開発」および基盤研究 A「二枚貝の脳ホルモンが制御する性分化と性成熟ーその分子機構と種苗生産への展開ー」により得られました。なお本成果は「新規プロモーター」として国際特許出願しています(出願番号: PCT/JP2022/030912, 出願日: 2022/08/15)。

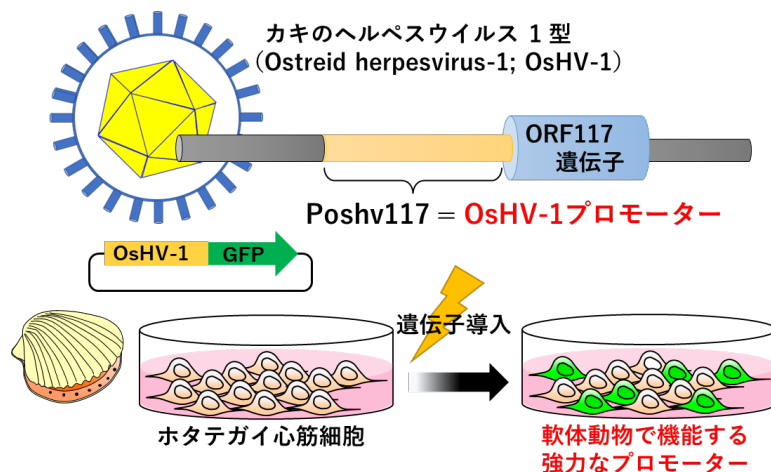


図 1. 本研究の概要

本研究ではカキヘルペスウイルス 1 型が有する全 136 遺伝子の中から、宿主への感染初期に高発現する ORF117 遺伝子に注目し、その上流領域が軟体動物の細胞で強いプロモーター活性を示すことを発見して OsHV-1 プロモーターと命名した。さらに OsHV-1 プロモーターにより GFP を発現するベクターをエレクトロポレーション法で遺伝子導入することで、ホタテガイ心筋細胞に GFP を高発現させることに世界で初めて成功した。

【詳細な説明】

二枚貝をはじめとする軟体動物は多様な進化を遂げた生物群であり、ユニークな生命現象の宝庫です。これらの生命現象を下支えする個々の遺伝子機能の研究は、モデル動物の研究からは得難い新発見に繋がる可能性を秘めています。しかし軟体動物における遺伝子の機能解析は、これらの生物群で遺伝子工学的手法の開発が大きく遅れているため、十分な研究ができていませんでした。

これまで遺伝子機能の解明が進んでいるマウスやゼブラフィッシュ等のモデル動物では、注目する遺伝子の発現を人為的に「抑制」あるいは「亢進」することで、細胞や個体に表れる形質の変化を調べ、その遺伝子機能を推定してきました。その中でも過剰発現系は、注目した標的遺伝子をプロモーターにより強制的に発現させ、標的遺伝子の発現を「亢進」状態にすることで起こる細胞や個体の変化から遺伝子機能を推定する手法です。この過剰発現系を構築するには、解析する細胞や個体において機能する強力なプロモーターの存在が不可欠です。これまで、哺乳類や魚類等の脊椎動物では、幅広いタイプの細胞で最も高い発現活性を示す強力な CMV (サイトメガロウイルス) や EF-1 α (ポリペプチド鎖伸長因子) プロモーターが用いられてきました。

しかし二枚貝を含めた水生無脊椎動物においては、これらの脊椎動物で使用されてきたプロモーターは十分に機能せず、これまで軟体動物における強力なプロモーターは存在しませんでした。これに対し本グループは、二枚貝に高い感染性を示し世界的な感染が確認されているカキヘルペスウイルス 1 型 (OsHV-1) に注目し、この中から二枚貝の細胞で機能する強力なプロモーターとして OsHV-1 プロモーターを発見しました (図 2 参照)。

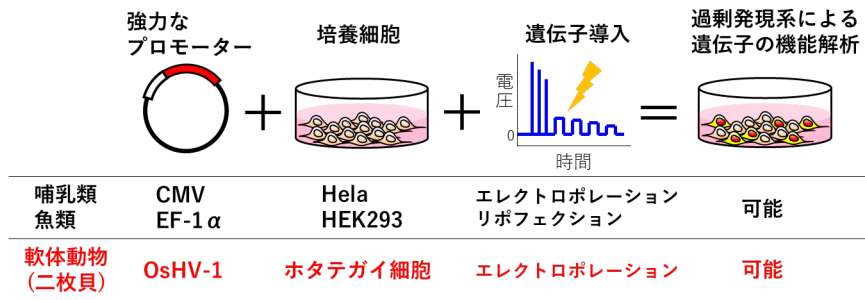


図 2. 脊椎動物の過剰発現系と本研究(赤字)

脊椎動物では強力なプロモーターと培養細胞が存在するため、遺伝子導入による過剰発現系を用いた遺伝子の機能解析が可能となっている。これに対し本研究は、OsHV-1 プロモーターとホタテガイ心筋細胞を開発したことで二枚貝の培養細胞を用いた過剰発現系を確立し、軟体動物における遺伝子の機能解析を可能にした。

本研究では第一に、軟体動物の細胞において正確なプロモーター活性を測定するためのアッセイ系を構築するため、二枚貝の中でも器官が独立したホタテガイを用い、初代培養細胞を樹立するための手法の開発に取り組みました。そ

の結果、ホタテガイ心筋を外植という方法で処理した場合に、安定的に初代培養細胞株を得ることに成功しました。

第二に、このホタテガイ心筋細胞への遺伝子導入法について検討しました。その結果、エレクトロポレーション法（電気穿孔法）により、細胞を生かした状態で遺伝子導入する条件をみいだしました。

第三に、カキヘルペスウイルス 1 型のウイルスゲノム配列中にある全 136 遺伝子の発現パターンを RNA-seq のデータから解析し、宿主への感染から速やかに高発現を示す最初期遺伝子（immediate early gene）として 6 遺伝子を選出しました。その後、最終的に最も高発現を示すプロモーターとして、Poshv117 を同定し OsHV-1 プロモーターと命名しました（図 3 参照）。

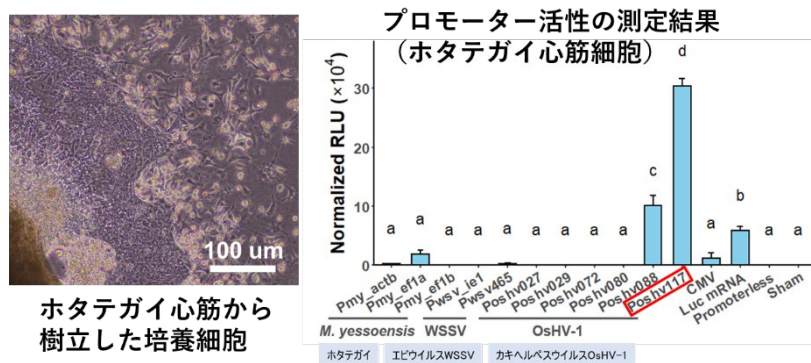


図 3. ホタテガイ心筋の培養細胞を用いたプロモーター活性の比較

各種プロモーターの活性を比較した結果、ホタテガイの内在性ハウスキーピング遺伝子の活性はいずれも低かった。一方、本研究で発見した OsHV-1 (Poshv117, 赤棒) のプロモーター活性は極めて高く、これまで二枚貝での活性が報告されている CMV プロモーターの約 25 倍高い活性を示した。

最後に、この OsHV-1 プロモーターの下流に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を接続した発現ベクターを構築し、様々な動物種の細胞に対して遺伝子導入を実施しました。具体的には、①エレクトロポレーション法によりホタテガイ心筋細胞へ導入、②マイクロインジェクション法によりゼブラフィッシュ受精卵に導入、③リポフェクション法により HEK293 細胞に導入しました。その結果、全ての動物細胞において GFP 蛍光が観察され、OsHV-1 プロモーターが十分な活性を示すことが確認されました（図 4 参照）。

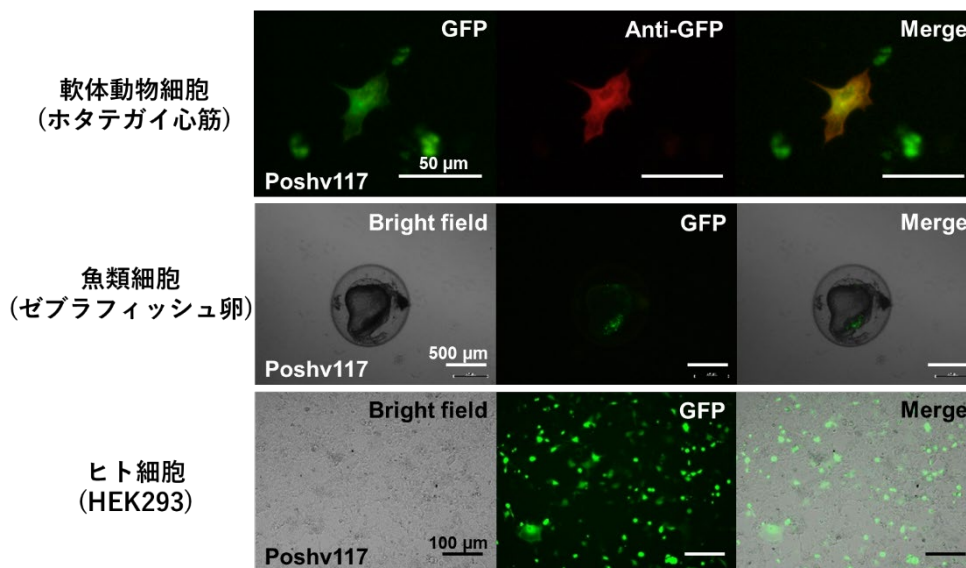


図 4. 0sHV-1 プロモーターによる GFP の強制発現（二枚貝、魚類、哺乳類）

0sHV-1 プロモーターで GFP を発現するベクターを遺伝子導入した結果、ホタテガイ心筋細胞、ゼブラフィッシュ受精卵、ヒト胎児腎細胞において明瞭な GFP の発現を確認した。

今後は、0sHV-1 プロモーターと二枚貝培養細胞を併用することで、再生、適応、生殖、老化等に関わる遺伝子を強制的に過剰発現させ、それらの遺伝子の機能解析を実施していく予定です。これにより二枚貝をはじめとする軟体動物門全体の遺伝子機能の解明に資する研究の展開が期待されます。さらに 0sHV-1 プロモーターの高い発現活性を利用することで、様々や有用遺伝形質を賦与した遺伝子組換え動物の作製や、薬や機能性タンパク質を発現する軟体動物の作製など、産業応用への展開も期待されます（図 5 参照）。

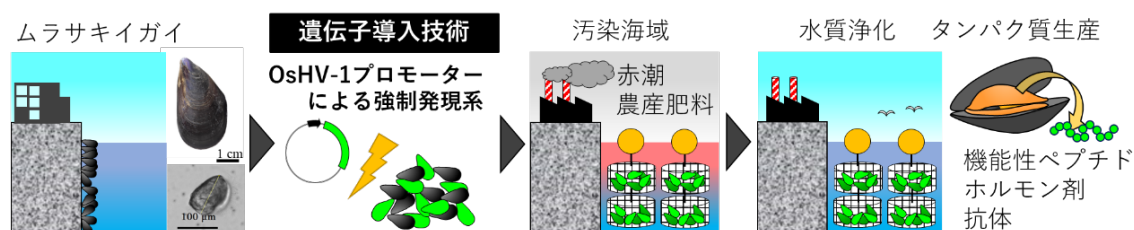


図 5. 二枚貝による機能性タンパク質生産と水質浄化

将来的な技術として、0sHV-1 プロモーターを用いた二枚貝への遺伝子導入により、「海を浄化しながら機能性タンパク質を生産する技術」の開発が考えられる。例えば発電所の水路にいるムラサキイガイに対し、0sHV-1 プロモーターを用いた *in vivo* 遺伝子導入を施し、赤潮の発生海域や富栄養化した汚染海域で飼育する。これにより二枚貝の過剰摂食により水質浄化を行うと共に、食用に適さないこれらの二枚貝から機能性タンパク質を回収することで付加価値を賦与する。その他、成長ホルモン等の機能性タンパク質を生産する二枚貝を作製することで養殖魚の餌としての利用も考えられる。

【論文情報】

タイトル : Gene delivery available in molluscan cells by strong promoter discovered from bivalve-infectious virus

著者 : Jeongwoong Yoon, Wen-Bin Gu, Mizuki Konuma, Mutsuko Kobayashi, Hayato Yokoi, Makoto Osada, Kazue Nagasawa*

掲載誌 : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

DOI : <https://doi.org/10.1073/pnas.2209910119>

【用語説明】

注1) プロモーター

プロモーターとは、ゲノム DNA 中に存在する遺伝子の上流領域の一部を指す。この領域に基本転写因子が結合することで、下流の遺伝子の転写が始まる。

注2) カキヘルペスウイルス 1 型

カキのヘルペスウイルス 1 型 (Ostreid herpesvirus-1; OsHV-1) は、マガキなど二枚貝の幼生や稚貝に感染し、大量死に関与する DNA ウイルス。OsHV-1 は世界各地に分布しており、国や地域により遺伝子にわずかな変異がある。1990 年代からフランスをはじめとするヨーロッパ沿岸で確認され、日本国内でも 2010 年代からカキ養殖がおこなわれている地域での感染が確認されている。

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学大学院農学研究科

水圏動物生理学分野

長澤 一衛(ナガサワ カズエ)

電話:022-757-4133

FAX:022-757-4132

E-mail:kazue.nagasawa.d6@tohoku.ac.jp

(報道に関すること)

東北大学大学院農学研究科 総務係

TEL:022-757-4003

FAX:022-757-4020

Email:agr-syom@grp.tohoku.ac.jp