

## ゼブラフィッシュによるコンビナトリアル・バイオエンジニアリング —研究開発と創薬への応用—

田丸 浩

### Research and Development of Combinatorial Bioengineering Using Zebrafish and Its Application on Drug Discovery

Yutaka TAMARU

Department of Life Science, Mie University Graduate School of Bioresources,  
1577 Kurimamachiya, Tsu, Mie 514-8507, Japan

(Received June 17, 2009)

The main challenge of the post-genomic era is to functionally characterize genes identified by the genome sequencing projects. Model organisms, including zebrafish (*Danio rerio*), are indispensable for this demanding task. Zebrafish has recently been successfully incorporated into large-scale genetic screens due to the optical clarity of the embryos and their accessibility to various experimental techniques throughout development. The attractiveness of the zebrafish as a model organism is enhanced by the biological availability of continuously improving genomic tools and methodologies for functional characterization of the genes. In addition, transparent zebrafish embryos are well suited to manipulations involving DNA or mRNA injection, cell labeling, and transplantation. Once the scheduled zebrafish genome project is complete, targeted genetic manipulations in zebrafish would be able to become even more desirable. In my laboratory, we propose that the “embryoarray technology” supports to characterize especially unknown proteins using zebrafish embryos which offer a platform for assessing the biological effects by not only chemical compounds including medical drugs, siRNAs (small interfering RNAs) and micro RNAs, but foreign genes that are never existing in zebrafish. Thus, zebrafish offers a high-quality, high-throughput bioassay tool for determining the biological effect of small molecules as well as for dissecting biological pathways. In this review, I would like to introduce a couple of recent data that we have constructed the gene expression system in zebrafish and have succeeded to produce several membrane-associated proteins. Furthermore, several tools with zebrafish embryos are available to examine the interactions between protein-protein using fully automatic high-throughput microinjection system.

**Key words**—combinatorial bioengineering; zebrafish; goldfish; protein production; antibody

#### 1. はじめに

ポストゲノム時代の主要な戦略の1つは、ゲノムシーケンシングプロジェクトによって同定された遺伝子機能の探索であり、これは合成論的なアプローチである。すなわち、“ポストゲノム・インフォマティクス”といわれている。<sup>1)</sup>一方、「コンビナトリアル・バイオエンジニアリング」は、新しい機能分子や新しい機能を有する細胞を「情報分子ライブラリーから創る」という合成論的なアプローチへの方向性を目指したものであり、「多様性 (Diversity)」・

「提示 (Display)」・「選択 (Directed selection)」という3つの柱 (3-D) からなる。今後の創薬研究においても、遺伝子機能の探索と新しい機能分子の創製はともに重要なテーマであると言えるが、これらのテーマに対して別々に取り組むのではなく、これからは様々な研究手法を統合して創薬研究を高速にドライブできるハイスループットなシステムバイオロジーの構築が期待されている。ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は脊椎動物であり、胚が透明で大量の遺伝学的スクリーニングが可能である。また、発生・分化過程を通じた種々の実験的技術が導入可能であることなどの理由から、創薬研究におけるハイスループットなシステムバイオロジーの実現に有効な特徴を数多く備えた実験動物であると言える。

本稿では、ゼブラフィッシュを活用したコンビナ

三重大学大学院生物資源学研究科生物圏生命科学専攻  
(〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577)

e-mail: ytamaru@bio.mie-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウム S05 で  
発表したものを中心に記述したものである。

トリアル・バイオエンジニアリングの実践例を紹介するとともに、実験モデルとしてのゼブラフィッシュのポテンシャルを最大限に引き出すための実験装置や研究成果についてまとめる。また最後に、われわれが提唱する“魚類によるバイオ産業革命”について紹介する。

## 2. ゼブラフィッシュのバイオアッセイツールとしての有用性

ゼブラフィッシュをモデル動物として用いる優位性はこれまでも十分に議論されてきたとおり、簡単に言うと以下ようになる。1) 飼育が容易でコストが安い、2) 多産で一度に数千個体を一度に試験できる、3) 発生速度が速く、世代交代期間が短い、4) 母体外で受精及び発生する、5) 胚が透明なため発生の様子や各個体における遺伝子及びタンパク質の動態を眼下に観察することができる、6) 器官が形態的にも機能的にもヒトとよく似ている、7) ヒト遺伝子のオーソログが多く保有し、遺伝子機能の解析結果をヒトに外挿しやすい、8) ゲノムシーケンシングプロジェクトがほぼ完了している、などの点が挙げられる。一方、ゼブラフィッシュの初期胚は直径 0.9 mm 前後、湿重 1 mg の分離性沈下卵で、薄くて丈夫な卵膜に覆われていて非常に扱いやすい。また、ピペットによるハンドリングが容易で、市販の 386 プレートの各ウェルに 1 個体ずつ収容して独立した実験を同時平行的に行うことができるためアッセイ系のハイスループット化が可能である。なお、同じ小型魚類のメダカは、付着性沈下卵で極めてハンドリングが悪く、産卵数も少ないためハイスループットな解析には不向きである。

このように、ゼブラフィッシュは脊椎動物でありながら容易な実験操作性とスピードを兼ね備え、コンビナトリアル・バイオエンジニアリング研究の最も重要な要素であるハイスループット・アッセイ系に最適な高等モデル動物である。

## 3. 分子ディスプレイツールとしての利用

コンビナトリアル・バイオエンジニアリングを展開する上で、情報分子 (DNA) を機能分子 (タンパク質) に変換し、機能分子を細胞や担体上に実験操作できる状態で提示させるプロセスは不可欠である。ゼブラフィッシュはマイクロインジェクションによる簡便な操作で外来遺伝子を発現させることが可能で、微生物操作並みの機能分子ディスプレイ

ツールとして利用できる。また、ゼブラフィッシュは脊椎動物に共通して保存される獲得免疫系を持つことから、抗原分子を input して抗体を output させるといった自然な免疫応答を反映した抗体ディスプレイツールとしても利用できる。

**3-1. 遺伝子発現系の開発** ヒトゲノム配列解読が完了して、病態の形成に関与する遺伝子の機能や一塩基多型 (SNPs) と疾患との易罹患性、並びに薬剤反応性との関連を調べる研究の重要性が増してきている。これらの研究に対して、標的タンパク質を大量にかつ安価に商業ベースで生産・供給するための技術開発は実用的に極めて重要である。ヒト組換えタンパク質の効率的な生産には、異種遺伝子が宿主内で安定に保持され、効率よく転写・翻訳され、合成されたタンパク質が宿主本来の分泌性タンパク質と同じ効率で細胞外に分泌生産され、安定に蓄積されることが望まれる。真核生物を宿主にした場合には、小胞体、ゴルジなどのタンパク質細胞内輸送系が分化しており、タンパク質はこれらの輸送系を経由して細胞外へ分泌され、シャペロン機能、糖鎖修飾活性、タンパク質分解活性など様々な活性を異種タンパク質の細胞外分泌へ最適化しなければならない。一般に、動物細胞を宿主とする遺伝子組換えは、医薬品を中心とした物質生産のみならず、基礎研究、トランスジェニック動物の作出、遺伝子治療など幅広い分野に必須の技術である。動物細胞培養による物質生産では、1) 生産性は微生物を宿主とした場合に比べてそれほど高くないが、2) 生産物にリン酸化、糖鎖・脂肪酸修飾など、微生物では期待できない *in vivo* と同様の修飾が可能であり、3) 一般的にコスト高である、という特徴を示す。一方、われわれの研究グループは動物細胞系を凌駕する新しいタンパク質生産システムとして、魚類初期胚を用いた遺伝子発現系を世界で初めて構築した。

### 3-1-1. ゼブラフィッシュ ゼブラフィッシュ



田丸 浩

三重大学大学院生物資源学研究科準教授/生命科学研究支援センター・バイオインフォマティクス部門兼任。1997年学術博士 (三重大学)。カルフォルニア大学デビス校 (Roy. H. Doi 教授) にてポストドク後、2000年より魚類を用いたバイオテクノロジー研究及びその応用研究を展開している。

を用いた遺伝子発現系による組換えタンパク質生産技術のアドバンテージを簡単に述べると次のようになる。すなわち、1) 遺伝子発現系の宿主生物として脊椎動物という利点を活かし、従来の組換えタンパク質発現技術では発現が困難であった膜タンパク質や酵素タンパク質の機能を保持したまま高品質な状態で生産可能である。2) 細胞培養に不可欠な高価な培地が不要であるため哺乳動物細胞系に比べて極めて安価にタンパク質生産が可能である。3) タンパク質生産量については、初期胚を大量に調製できるためスケールアップが容易で、また、得られたトランスジェニック個体の単離が容易であり、それを繁殖させることでタンパク質の永続的な大量生産が可能である。なお、ゼブラフィッシュの遺伝子導入効率は、後述の pZef 又は pZex を利用した場合、蛍光タンパク質遺伝子を指標として約 30-70% であり、F2 個体まで二世継代飼育すれば stable line を取得できる。さらに、われわれの研究室では選抜育種によって通常より成長の早いゼブラフィッシュの取得に成功しており、この魚を使えばおよそ 2 ヶ月で世代交代が可能である (未発表)。われわれは、ゼブラフィッシュ用遺伝子発現ベクターとして pZef 及び pZex を開発した (特許公開 2007-143497)。従来、ツメガエル由来の EF1- $\alpha$  プロモーターを搭載した pXI を利用していたが、全身でユビキタスに発現することを狙っても pXI では筋組織に偏って導入タンパク質が発現することが多く、遺伝子導入及び発現の安定性に欠けていた。そこで、ゼブラフィッシュに最適化した全身発現系ベクターとしてゼブラフィッシュ由来の EF1- $\alpha$  プロモーターを搭載した pZef を開発した。pZef は pXI と比較して導入タンパク質の発現量が多く、全身でユビキタスに安定して発現させることができる [Fig. 1(A)]。一方、pZex は hatching gland と呼ばれる胸部付近で孵化時に発現する分泌型プロテアーゼのプロモーターを搭載しており、初期発生過程において時間・空間的に特異的な発現を誘導することができる [Fig. 1(B)]。また一般に、これまでの動物細胞用ベクターでは、遺伝子発現が確実に誘導されることを優先して設計されているために、EF1- $\alpha$  やアクチンなどの構成的に全身で発現する遺伝子のプロモーターが使用されてきた。細胞レベルで遺伝子を発現させる場合はこれでよかったが、個体レベ

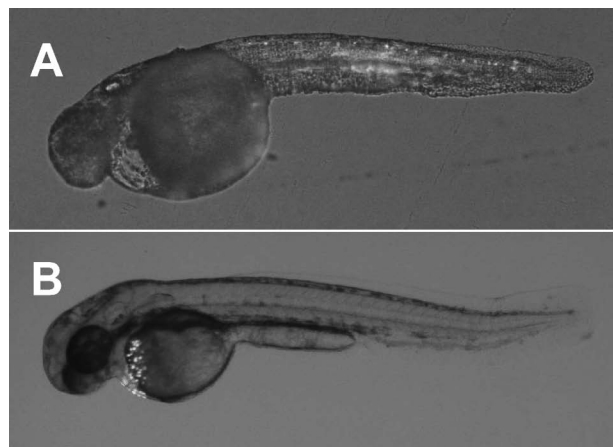


Fig. 1. Protein Expression by Zebrafish  
(A) Ubiquitous expression; (B) Cell-specific expression.

ルでの遺伝子発現では、全身発現用プロモーターを搭載したベクターは生体に対して毒性を示すような遺伝子の場合には効率的な遺伝子発現がみられないばかりか、個体発生さえも妨げられる可能性がある。したがって、本法のように個体レベルで遺伝子発現させる場合は、目的のタンパク質の特性によって組織特異的な発現を誘導するようなプロモーターの選択が有効である。

**3-1-2. キンギョ** われわれは、さらなる受精卵の大量確保の容易性と廉価な飼育コストを兼ね備えた、より実用的な遺伝子発現系宿主として、キンギョに注目した。キンギョは、ゼブラフィッシュと同じコイ科魚類であり、愛玩動物として古来より親しまれてきた。ゼブラフィッシュに比べて産卵頻度は少ないものの一度に得られる受精卵の量は重量比で数十倍以上あり日本各地でいつでも入手可能であり、特別な飼育設備がなくても飼育できることから、これらの点でゼブラフィッシュを圧倒している。ゼブラフィッシュ初期胚で発現が確認されている上述の pZex ベクター及び pZef ベクター、またそのほかの発現ベクターのそれぞれにレポーター遺伝子として蛍光タンパク質 (GFP) を連結したコンストラクトを、キンギョ (リュウキン種) の受精卵にマイクロインジェクションした。その結果、いずれのベクターでも蛍光タンパク質の発現が確認され、世界で初めてトランスジェニックキンギョの作成法を確立した (特願 2009-107344)。蛍光タンパク質の発現量や発現場所及び発現時期は、各々のベクターをゼブラフィッシュで発現させた場合と類似

していた。このように、ゼブラフィッシュとキンギョに共通してタンパク質発現が可能なベクター系を開発したことで、ゼブラフィッシュでパイロット生産した目的タンパク質を、必要に応じてキンギョでラージスケール生産にシームレスに移行できるタンパク質生産プロセスが実現した。

#### 4. ゼブラフィッシュを用いた新規バイオアッセイ

次に、これまでにわれわれがゼブラフィッシュを用いて開発した種々のバイオアッセイツールについて紹介する。

#### 4-1. FRET による *in vivo* タンパク質相互作用解析

異なったタンパク質の相互作用を調べる方法として、蛍光タンパク質を利用した FRET (Fluorescence resonance energy transfer, 蛍光エネルギー移動) 法は非常に有用である。<sup>2)</sup> FRET の原理について言及しないが、最も汎用されているのは CFP (Cyan fluorescent protein) と YFP (Yellow fluorescent protein) などドナーとアクセプタになり得る波長特性を持った蛍光タンパク質ペアを、解析したい 2 種のタンパク質にそれぞれ融合させて細胞に発現させ、FRET の観察によって細胞内で起こるタンパク質間の相互作用を検出するものである。

われわれは、ゼブラフィッシュ初期胚でも FRET 法が機能し、生きた個体内においてタンパク質相互作用解析が可能かどうかを、東京大学大学院医学系研究科の飯野正光教授らとともに検証した。相互作用のモデルタンパク質としてミトコンドリア依存性アポトーシスを促進する BAD と、BAD と結合して抗アポトーシス作用をもたらす 14-3-3 $\zeta$  を用いた。初期発生に有害な影響を及ぼす BAD は pZex で孵化腺細胞に特異的に発現するように、14-3-3 $\zeta$  は pXI を用いて全身で発現するようにデザインしたタンデム発現ベクターを構築し [Fig. 2(A)], ゼブラフィッシュ受精卵に導入した。その結果、BAD と 14-3-3 $\zeta$  の発現部位が重なる孵化腺細胞において FRET が観察され [Fig. 2(B)], 生きたゼブラフィッシュ初期胚においても FRET によるタンパク質の相互作用解析が可能なること、並びに、ゼブラフィッシュにおいても BAD と 14-3-3 $\zeta$  は相互作用することが確認できた。本技術は、ゼブラフィッシュで発現可能なタンパク質ならばあらゆるタンパク質の相互作用解析が行える柔軟な汎用性を持って

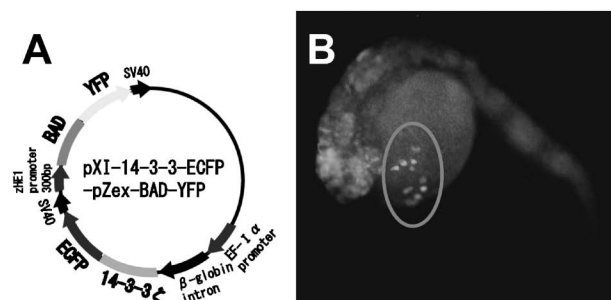


Fig. 2. Analysis of Protein-Protein Interaction by Zebrafish (A) Expression vector for multiple genes; (B) Observation of the interaction between BAD and 14-3-3 $\zeta$  by FRET.

おり、今後の活用が期待される。

#### 4-2. タンパク質ミリスチル化解析

タンパク質の翻訳後修飾はタンパク質の機能発現に重要な役割を果たしており、疾病の原因や病態の形成機序に密接に係わっている。従来、タンパク質の翻訳後修飾を解析するためには研究対象から組織サンプルを採取して、種々の前処理を経てから、電気泳動法や質量分析法などによって直接測定するしか方法がなかった。その中でもミリスチル化反応は、標的タンパク質の N 末端にミチスチン酸を付加する翻訳後修飾で、タンパク質の局在化に重要な役割を果たしており、細胞のがん化<sup>3)</sup>やウイルス<sup>4)</sup>の感染機序にも関与していることからタンパク質ミリスチル化反応を担う MetAP (Methionine aminopeptidase) や NMT (N-Myristoyltransferase) は抗がん剤や抗ウイルス薬を開発するための創薬ターゲットとなっている。そこで、ゼブラフィッシュの遺伝子発現系を応用してタンパク質ミリスチル化反応をゼブラフィッシュ生体内で可視化する方法の開発に取り組んだ。GFP の N 末端にミリスチル化モチーフである M-G-x-x-S/T 配列 (x は任意のアミノ酸) を付加した pZex-myriGFP とモチーフを持たない pZex-GFP を作成し、それぞれゼブラフィッシュ初期胚に導入・発現させて観察した。pZex-GFP を発現した孵化腺細胞では GFP が細胞全体に発現しているのに比べて [Fig. 3(A)], pZex-myriGFP を導入した細胞では GFP は孵化腺細胞の細胞膜に局在していた [Fig. 3(B)]. これはミリスチル化モチーフを付加した GFP では内在性の MetAP や NMT により GFP がミリスチル化された結果、細胞膜親和性が強くなり細胞膜に局在したことを示している。本技術は、ミリスチル化 GFP の局在性を観察すること

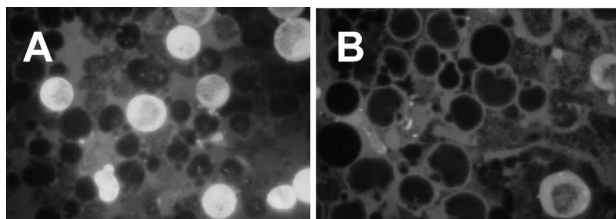


Fig. 3. Bioimaging of Protein Myristoylation by Zebrafish  
(A) Expression of EGFP; (B) Expression of myr-EGFP.

で細胞内のミリスチル化活性のモニタリングが可能になり、生きた個体レベルでのタンパク質ミリスチル化関連酵素に注目した創薬スクリーニングに道を開くものである。

**4-3. ヒト POMGnT の発現解析** 創薬研究において膜タンパク質はメジャーなターゲットであるが、ヒト由来の膜貫通型タンパク質のなかには、コストの問題だけでなく、技術的な限界によって培養細胞系を用いてもタンパク質の機能解析に必要な量の組換えタンパク質の調製が困難な場合がある。O-マンノース型糖転移関連酵素の1つである POMGnT1 (Protein O-mannose  $\beta$ 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1) は MEB (muscle-eye-brain) disease として知られる先天性筋ジストロフィーの原因分子であり、本病態の治療ターゲットでもある。<sup>9)</sup> POMGnT1 は培養細胞系を用いても効率よく発現させることが困難な膜貫通型タンパク質であるが、東京都老人総合研究所の遠藤玉夫博士らとともにゼブラフィッシュの遺伝子発現系を用いてヒト由来 POMGnT1 発現を試みたところ、その発現に成功した [Fig. 4 (A)]. さらに、組換え POMGnT1 の活性を測定したところ、酵素活性が確認できたことから正常な機能を持った状態で発現したと考えられた [Fig. 4 (B)]. なお、酵素活性の測定に要したゼブラフィッシュ初期胚は 50 個体程度であった。このように、ゼブラフィッシュ遺伝子発現系は、ヒト由来膜貫通型タンパク質の発現においても動物培養細胞系に匹敵する性能を有しており、しかも圧倒的なコストパフォーマンスも兼ね備えていることから、今後、様々なヒト由来膜タンパク質の生産に活用されることが期待される。

**4-4. メタボローム解析** オミックス解析法の1つであるメタボローム解析は、生体試料中の全代謝物 (メタボローム) の変化をバイアスをかけずに

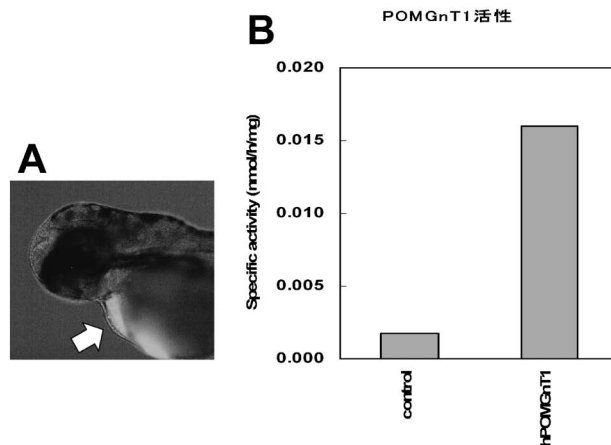


Fig. 4. Expression of Human POMGnT1 (hPOMGnT1) by zebrafish

(A) Immunohistochemical staining of zebrafish embryo (48 hpf) anti-hPOMGnT1 antibody; (B) Enzymatic assay of hPOMGnT1.

一斉測定できる網羅的解析手法である。<sup>6)</sup> メタボロームは、アミノ酸や糖質、脂質、核酸などの低分子の陽イオン性、陰イオン性及び非イオン性物質から構成され、そのプロファイルは高次生命活動の様々な場を非常に鋭敏かつ正確に反映していると考えられている。そのため、メタボロームプロファイルはセントラルドグマ横断的な非常に複雑な生命現象を端的に反映する新しい指標として注目されている。われわれは2つの切り口でゼブラフィッシュのメタボローム解析に取り組んでおり、その一端を紹介する。まず1つ目は、ゼブラフィッシュ初期発生過程における経時的メタボロームプロファイルの変化に基づいた新規生体評価法の開発について、大阪大学大学院工学研究科の福崎英一郎教授と共に検討している。すなわち、ゼブラフィッシュの初期発生は非常に速く、28°C 下で培養すると受精後わずか48時間で基本的な臓器の原基を備えた稚魚に成長する。これまでもゼブラフィッシュ初期発生胚の形態変化や遺伝子発現プロファイル指標にした生体評価法があり発生学や毒性学の観点からよく利用されてきたが、得られた測定結果にノイズが多いことや因果関係がリンクしないことが多くあった。そこで、発生・分化過程における経時的なメタボロームプロファイルの変化に注目し、メタボロームプロファイルの変化パターンが生体評価の指標として利用できるかについて検討した。その結果、初期発生過程のメタボロームプロファイルは、受精後の時間経過に伴って変化し、各発生過程に特徴的なメタボ

ロームプロファイルを取得した。また、目視による観察では形態がほとんど変化していないような発生過程においても、メタボロームプロファイルは刻々と変化しており、形態変化よりも鋭敏に発生過程の状況を投影できることが判明した。よって、メタボロームプロファイルは発生・分化過程における新しい生体評価の指標として利用できることを見出した。2つ目は、薬理学の観点からゼブラフィッシュとメタボローム解析を組み合わせた薬理メタボロミクスについて慶応義塾大学先端生命科学研究所の曾我朋義教授とともに取り組んでいる。この共同研究に先立ち、マウスを用いた実験系でアセトアミノフェンによる薬剤性急性肝炎の新規バイオマーカーとしてオフタルミン酸が発見された。<sup>7)</sup>そこで、同様の代謝カスケードがゼブラフィッシュにも保存されているかどうかについて検討した。アセトアミノフェン曝露後のゼブラフィッシュの血清及び脳を採取して、それらのメタボロームを測定した。その結果、ゼブラフィッシュにおいてもアセトアミノフェン誘導性のオフタルミン酸の上昇が認められ、マウスと同様の代謝カスケードが保存されていることが明らかとなった。また、マウスよりもはるかに小さいゼブラフィッシュにおいてもマウスと同様の手法によるメタボローム解析が可能であったことから、今後はより安価でハイスループットな薬理メタボロミクスを展開するうえで有効な実験系となるだろう。

## 5. 魚類によるバイオ産業革命

18世紀末からイギリスで起こった産業革命は、織物業の生産工程が工場制手工業から機械制大工業へ変革したことにより、産業構造や社会構造にパラダイムシフトをもたらした。21世紀の今日、ゼブラフィッシュという実験モデルは個体レベルでコンビナトリアル・バイオエンジニアリングを展開できる唯一の脊椎動物である。しかしながら、ゼブラフィッシュが大量の生物学やバイオエンジニアリングの実践に向けた資質をいくら持ち合わせていても、これまでの実験的手法をそのまま応用していたのではそのアドバンテージを有効に活用できない。したがって、ゼブラフィッシュを用いた本格的なコンビナトリアル・バイオエンジニアリング研究を実現するためには、産業革命に匹敵するようなシステムチックかつハイスループットなシステムバイオロジーを展開する必要があり、これまでにないまったく新

しい発想とそれを可能にする新しい実験装置の開発が不可欠である。

**5-1. ハイスループットシステムの開発** いかなる実験系においても、実験量はその実験系の中で最も遅い段階に律速されるため、ハイスループットな実験系を構築するためには、実験系全体でバランスよくスループットを向上させていく必要がある。そこで、われわれはコンビナトリアル・バイオエンジニアリングに基づいたゼブラフィッシュのハイスループットなシステムバイオロジーの実現を目指し、様々なハイスループット化デバイスを開発したので紹介する。

**5-1-1. 受精卵製造装置** ゼブラフィッシュの飼育・採卵システムを独自に設計して大量の初期胚をコンスタントに調達することに成功した。わずか9 m<sup>2</sup>の占有面積で常時10000個/日以上 of 受精卵の生産が可能で、従来法と比べて5倍以上の生産能力と大幅な省力化を達成している [Fig. 5(A)]。

**5-1-2. エンブリオアレイ** アレイ化技術はこれまでに核酸、ペプチド、タンパク質、培養細胞などのアレイングを実現し、コンビナトリアルテクノロジーと連携させることで、様々な *in vitro* アッセイ系で解析速度を著しく加速させた。エンブリオアレイは、ゼブラフィッシュ初期胚を専用のマイクロプレート上にアレイングして、初期胚の操作性を飛躍的に高めることに成功した。初期胚をエンブリオアレイ化することで、従来は1個体ずつ別々に操作していた作業を、数百個体まとめて簡便かつ大量に操作できるようになった。さらに、1個体丸ごとアレイ化するエンブリオアレイでは、*in vitro* アッセイ系より包括的な生命情報が得られる *in vivo* アッセイ系の構築も同時になし遂げている。

**5-1-3. 自動インジェクション装置** 実験者の手技によるマイクロインジェクションは、時間や労力がかかる上に、実験者の技量に結果が大きく左右されることから、実験全体のスループットを低下させる最大のボトルネックになっている。そこで、熟練した実験者と同等のスキル及び処理能力を有する自動インジェクション装置を開発した [Fig. 5(B)]。本装置は、エンブリオアレイ化した初期胚に100 nlレベルのインジェクション容量を実現、20個/分の一定のスピードでのインジェクション操作が可能である。さらに、静電力を利用した専用

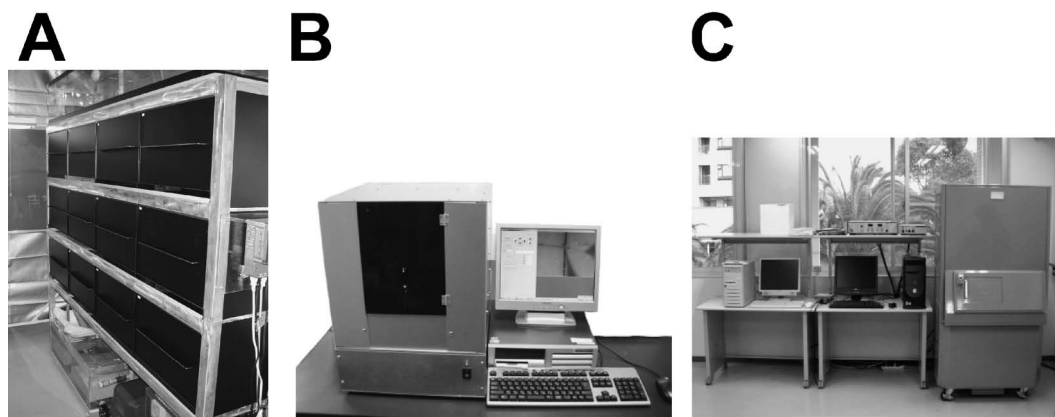


Fig. 5. High-throughput Screening System with Zebrafish Embryos  
(A) Oosperm recovering system; (B) Fully automatic injection system; (C) Integrated bioimaging system.

トレイを使用することで、受精卵のアレイも簡便・迅速に行うことができる。また、監視用に備え付けた CCD カメラはインジェクション後の発生過程をリアルタイムに観察することができ、顕微鏡下で 1 個体ずつ観察する煩わしさを解消している。現在、さらなるハイスループット化を目指して、インジェクション装置の改良と受精卵の自動分注技術の開発を行っている。

**5-1-4. 発現タンパク質の自動検出装置** 外来遺伝子の発現を知る方法の 1 つとして、蛍光タンパク質などをレポーターとする方法があるが、レポーター遺伝子発現個体の確認、選別は手作業により行われている。そのため、ここも実験全体のハイスループット化を阻む一因となっていた。そこで、初期胚に導入した目的遺伝子の発現を迅速に確認するための装置として、発現タンパク質の自動検出装置の開発に取り組んでいる。本装置は、レポーターである蛍光タンパク質の発現を CCD カメラにより検出し、色調の違いに基づいて目的遺伝子の発現を判定することで、エンブリオアレイ上の複数の初期胚から導入遺伝子が発現した個体を迅速に確認、選別できる。

**5-1-5. 統合型生体画像撮影装置** 初期胚を効率よく詳細に観察するための統合型画像撮影装置を開発した [Fig. 5(C)]。本装置は可視光視野撮影装置、蛍光視野撮影装置、及び軟 X 線視野撮影装置を 1 つに収めた装置で、多穴プレートに収容した初期胚を自動的に 3 視野から撮影可能であり、各視野の画像に加えて異なる視野からの画像を重ね合わせた合成画像を出力できる。

**5-2. ゼブラフィッシュを用いたコンビナトリアルライブラリーからのハイスループットなスクリーニング系の構築** コンビナトリアル・バイオエンジニアリングを応用した創薬研究において、cDNA, mRNA, siRNA/miRNA, ペプチド、化学化合物などのコンビナトリアルなライブラリーからのスクリーニング工程が必須となるが、この工程がしばしば研究全体のスループットを低下させるボトルネックとなりやすい。しかしながら、これまでに紹介したゼブラフィッシュを活用するためのツールを組み合わせることで、ゼブラフィッシュを用いた分子ライブラリーのハイスループットなスクリーニング系が構築できる。すなわち、Fig. 6 に示すように、各種のコンビナトリアルなライブラリーの各分子をゼブラフィッシュ初期胚へハイスループットインジェクションして生体内における機能分子の発現や生体応答を観察し、各分子が潜在的に有する生命機能を 1 つずつ、かつ、ハイスループットに評価して、研究者の意図に合致した分子をスクリーニングしたり、標的遺伝子やその産物についてのネットワーク解析が可能になると考えている。

## 6. おわりに

創薬研究において、従来のゼブラフィッシュを用いた研究手法では、比較生物学の観点からヒトの発生学や薬理学作用を推定したりするだけに留まっていた。しかし、筆者らのゼブラフィッシュを用いたコンビナトリアル・エンジニアリング研究やシステムバイオロジーの実践は、ポストゲノム時代に得られた遺伝子情報や様々な最新の分析テクノロジーを積極的に注入することで、低コストでかつ幅広い研

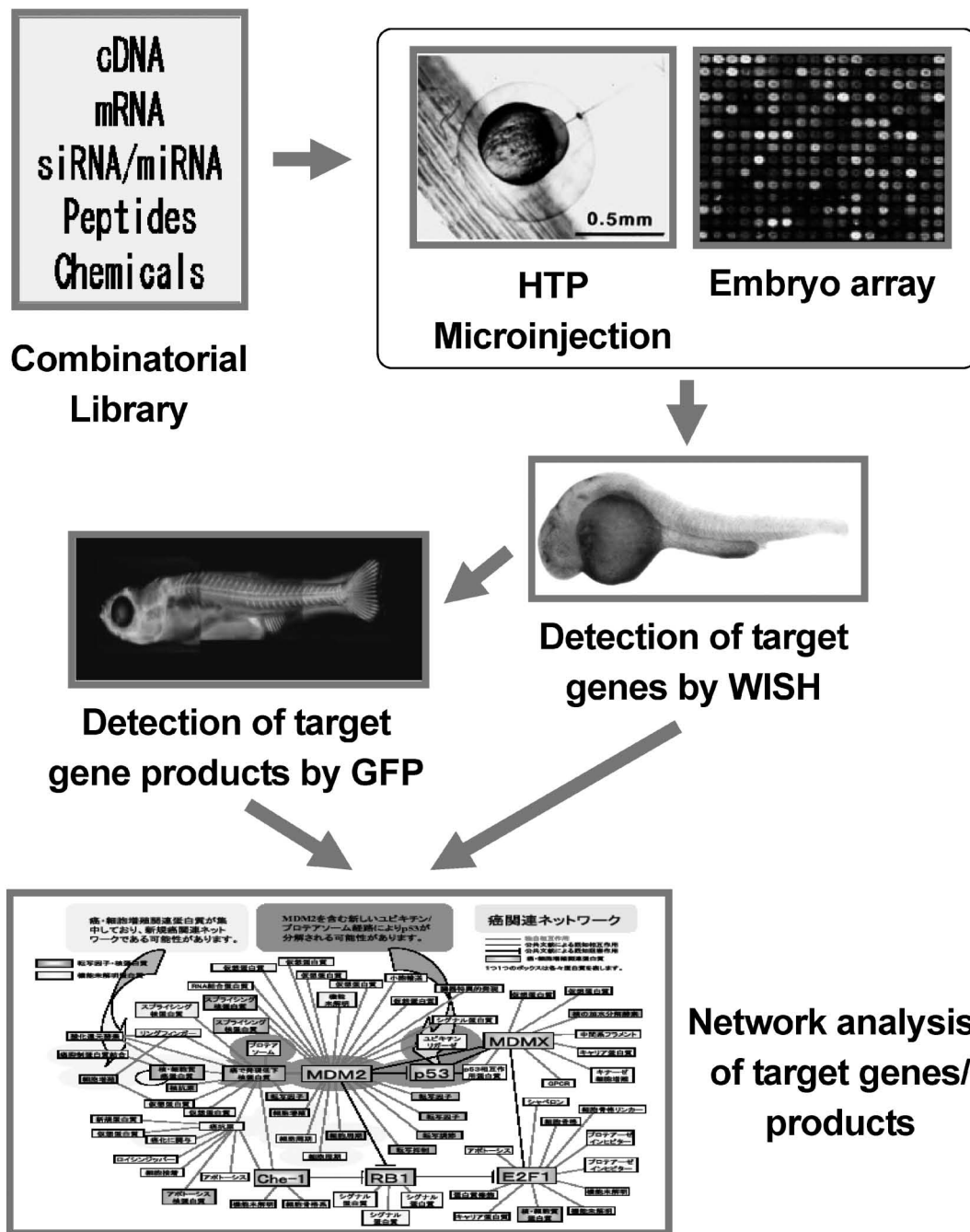


Fig. 6. Schematic Image of Screening of Combinatorial Library and Network Analysis by Zebrafish “Embryoarray”

究テーマに柔軟に応用可能であり、まったく新しいハイスループット化の研究プロセスを開拓することで統合的な創薬研究を実現できる可能性がみえてきた。さらに今後は、実験モデルとしての魚類にDNA情報という無尽蔵・無制限・ランダムな情報資源を活用して自然界に存在しないような機能分子を創製させることで、次世代の創薬研究に貢献することが期待される。

REFERENCES

- 1) Kanehisa M., “Post-genome Informatics,” Oxford University Press, Oxford, 2000.
- 2) Zal T., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **640**, 183–197 (2008).
- 3) Selvakumar P., Lakshmikuttyamma A., Shrivastav A., Das B., Dimmock R., Sharma K., *Prog. Lipid Res.*, **46**, 1–36 (2007).



- 
- 4) Shoji S., *Seikagaku*, **70**, 222–226 (1998).
  - 5) Endo T., Toda T., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1641–1647 (2003).
  - 6) Cascante M., Marin S., *Essays Biochem.*, **45**, 67–81 (2008).
  - 7) Soga T., Baran R., Suematsu M., Ueno Y., Ikeda S., Sakurakawa T., Kakazu Y., Ishikawa T., Robert M., Nishioka T., Tomita M., *J. Biol. Chem.*, **281**, 16768–16776 (2006).