

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5527684号
(P5527684)

(45) 発行日 平成26年6月18日(2014.6.18)

(24) 登録日 平成26年4月25日(2014.4.25)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
A O 1 K	67/027 (2006.01)	A O 1 K	67/027
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
G O 1 N	33/15 (2006.01)	G O 1 N	33/15 Z
G O 1 N	33/50 (2006.01)	G O 1 N	33/50 Z

請求項の数 4 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2009-211821 (P2009-211821)	(73) 特許権者	504202472
(22) 出願日	平成21年9月14日(2009.9.14)		大学共同利用機関法人情報・システム研究
(65) 公開番号	特開2011-55801 (P2011-55801A)		機構
(43) 公開日	平成23年3月24日(2011.3.24)		東京都立川市緑町10番3号
審査請求日	平成24年6月19日(2012.6.19)	(74) 代理人	110000084
			特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700
			弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ボツリヌス毒素遺伝子トランスジェニックフィッシュ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

G a l 4 をコードする遺伝子、及び U A S の下流に配列番号 1 ~ 4 から選ばれる塩基配列のボツリヌス毒素をコードする遺伝子が組み込まれた配列が導入されており、ボツリヌス毒素をコードする遺伝子の発現に基づく麻痺又は運動障害の表現型を生じるトランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項2】

請求項1記載のトランスジェニックゼブラフィッシュ又はその胚に、被検物質を作用させ、麻痺又は運動障害の程度を検出することを特徴とするボツリヌス毒素活性調節剤のスクリーニング方法。

【請求項3】

酵母転写因子 G a l 4 をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックゼブラフィッシュ由来の受精卵に、U A S 配列の下流に配列番号 1 ~ 4 から選ばれる塩基配列のボツリヌス毒素をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを注入することを特徴とする請求項1記載のトランスジェニックゼブラフィッシュの作製方法。

【請求項4】

酵母転写因子 G a l 4 をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックゼブラフィッシュと、U A S 配列の下流に配列番号 1 ~ 4 から選ばれる塩基配列のボツリヌス毒素をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックゼブラフィッシュとをかけあわせることを特徴とする請求項1記載のトランスジェニックゼブラフィッシュの作製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ボツリヌス毒素遺伝子を有するトランスジェニックフィッシュ及びその利用に関する。

【背景技術】

【0002】

ボツリヌス毒素は分子量が15万ほどの蛋白質で、ボツリヌス菌が産生する毒素である。ボツリヌス毒素は神経筋接合部などでアセチルコリンの放出を妨げる働きをするが、作用は末梢性に限られ、筋弛緩・鎮痛作用などが確認されている。

10

その作用を利用して、医療用医薬品としてAlan B. Scottにより、斜視に対し極めて微量のA型毒素が使用されたのを初め、多くの国で様々な疾患に用いられている。日本国内においてはA型ボツリヌス毒素製剤が注射剤として、1996年に眼瞼痙攣、2000年に片側顔面痙攣、2001年に痙性斜頸、2009年には2歳以上の小児脳性麻痺患者における下肢痙縮に伴う尖足の適応で承認されている。また、2006年まで、B型ボツリヌス毒素の臨床試験も行われていた。米国においては、斜視、痙性斜頸、眼瞼痙攣に加え、多汗症の適応に承認されている。

【0003】

近年では医療用としてだけでなく、美容外科領域において筋弛緩作用を応用した「皺取り」や「輪郭補正（エラ取り）」の目的で使用されていることが多く、日本国内においても使用されている。

20

また、過活動性膀胱やアカラシアの治療にもボツリヌストキシンの局所注射が有効というデータがある。

【0004】

ボツリヌス毒素には、A、B、C、D、E、F及びGの7種類の血清型があり、動物種により、その毒性、強度等が相違し、それぞれの毒性を検出する必要がある（非特許文献1、特許文献1参照）。ボツリヌス毒素の検出方法としては、マウスの腹腔内に毒素を投与し、その死亡を確認する方法、酵素抗体法（ELISA法）、イムノPCR法及び改良エンドペプチダーゼ法が知られている。しかし、マウス試験法は、多数のマウス実験施設が必要である等多くの労力と費用を要するとともに、死亡の確認であるため精度が低い。また酵素抗体法やエンドペプチダーゼ法は、感度の高い抗体が必要であることに加え、蛋白質を検出できるが毒素活性自体を検出できないという欠点がある（特許文献2）。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2005-336201号公報

【特許文献2】特開2009-132686号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】J. TOXICOL. - TOXIN REVIEWS, 18(1), 17-34(1999)

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、本発明の課題は、ボツリヌス毒素の蛋白質や抗体等ではなく、ボツリヌス毒素活性、すなわち神経筋接合部におけるアセチルコリン放出抑制作用を直接検出することのできる動物モデルを提供しようとするものである

【課題を解決するための手段】

【0008】

そこで本発明者は、下等動物であり、1回の産卵で多数の個体を採取できる魚類に着目

50

し、ボツリヌス毒素遺伝子の導入を試みたところ、該遺伝子が導入できるとともに、胚及び個体においてボツリヌス毒素遺伝子の発現に基づく、麻痺又は運動障害の表現型が明確に生じることを見出し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、ボツリヌス毒素をコードする遺伝子が導入され、該遺伝子が発現していることを特徴とするトランスジェニックフィッシュを提供するものである。

【0010】

また、本発明は、上記のトランスジェニックフィッシュ又はその胚に、被検物質を作用させ、麻痺又は運動障害の程度を検出することを特徴とするボツリヌス毒素活性調節剤のスクリーニング方法を提供するものである。

10

【0011】

また、本発明は、酵母転写因子Gal4をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックフィッシュ由来の受精卵に、UAS配列の下流にボツリヌス毒素をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを注入することを特徴とする上記のトランスジェニックフィッシュの作製方法を提供するものである。

さらに、本発明は、酵母転写因子Gal4をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックフィッシュと、UAS配列の下流にボツリヌス毒素をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックフィッシュとをかけあわせることを特徴とする上記のトランスジェニックフィッシュの作製方法を提供するものである。

20

【発明の効果】

【0012】

本発明のトランスジェニックフィッシュは、ボツリヌス毒素活性の本体である末梢性の麻痺又は運動障害を発現するので、これを用いれば導入した遺伝子の毒素活性自体を正確かつ簡便に検出することができる。また、ボツリヌス毒素活性自体を抑制する物質あるいは当該毒素活性を増強する物質（調節物質）をスクリーニングすることができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】コドンゼブラフィッシュ向けに最適化したボツリヌス毒素軽鎖遺伝子の構築を示す図である。

【図2】ゼブラフィッシュ型ボツリヌス毒素をもつプラスミドDNAをGal4を母性発現する胚に微量注入により導入する手法を示す図である。

30

【図3】本発明トランスジェニックフィッシュの運動性（A）及びボツリヌス毒素遺伝子の最適化の有無によるGFP発現性及び毒素活性発現性（B）を示す図である。

【図4】神経細胞でGal4を発現するトランスジェニックフィッシュの作製（UAS：GFPリポーターフィッシュとかけあわせることにより視覚化）を示す図である。

【図5】神経細胞でGal4を発現するトランスジェニックフィッシュとUASの下流にゼブラフィッシュ型ボツリヌス毒素遺伝子をもつトランスジェニックフィッシュをかけあわせて二重トランスジェニックを作製することを示す図である。

【図6】二重トランスジェニックフィッシュの運動障害又は麻痺の状態を示す図である。

40

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明のトランスジェニックフィッシュは、ボツリヌス毒素をコードする遺伝子が導入されており、該遺伝子が発現していることを特徴とする。本発明においてトランスジェニックフィッシュには、ボツリヌス毒素遺伝子の発現に基づく麻痺又は運動障害等の表現型を生じている限り、ボツリヌス毒素をコードする遺伝子がゲノム中に導入されている場合、及びプラスミド等のような形態で細胞内に一過性に保持している場合も含まれる。

【0015】

ボツリヌス毒素（*Botulinum toxin*）は、分子量が15万ほどの蛋白質で、ボツリヌス菌が産生する毒素である。AからGまで7種類の異なるタイプが知られている。図1はタイプB蛋白質の構造を示している。これらボツリヌス毒素は、軽鎖（li

50

ght chain) (Bの場合は、1番目から440番目のアミノ酸まで)と重鎖 (heavy chain) からなる。Light chainは細胞内で、synaptobrevin、syntaxin、SNAP25などの蛋白質の切断活性をもつ。Heavy chainは毒素蛋白質が細胞内へ侵入する際に必要とされる。

本発明に用いられる遺伝子としては、タイプAからタイプGのいずれの蛋白質をコードする遺伝子でもよいが、これらの蛋白質をコードする遺伝子のうち、その機能から、少なくとも軽鎖をコードする遺伝子を含むものが好ましい。

タイプA～Gの蛋白質をコードする遺伝子は、公知である。

【0016】

ボツリヌス毒素をコードする遺伝子は、細菌由来であり、そのままでは魚類で発現しないことがある。そこで、発現させるアミノ酸配列は変更させずに、同じアミノ酸をコードするコドンに最適化するのが、望ましい。当該最適化は常法により行うことができる。タイプA、B、C及びEのゼブラフィッシュ型に最適化した遺伝子を配列番号1～4に示す。

10

【0017】

ボツリヌス毒素をコードする遺伝子は、効率良く発現させるために、Gal4-UASシステム発現制御系、すなわち、転写制御因子Gal4とその認識配列UASとからなる遺伝子の発現制御下にあるのが好ましい。より詳細には、ボツリヌス毒素をコードする遺伝子は認識配列UASの下流に組み込むのが好ましい。この融合遺伝子をGal4を発現するフィッシュに導入することにより、Gal4-UASシステム発現系によりボツリヌス毒素が発現するトランスジェニックフィッシュが作製できる。このトランスジェニックフィッシュには、Gal4をコードする遺伝子と、UASの下流にボツリヌス毒素をコードする遺伝子とが導入されている。

20

【0018】

本発明のトランスジェニックフィッシュは、ボツリヌス毒素遺伝子が発現している点が重要である。ボツリヌス毒素遺伝子の発現の形態としては、胚又は個体において麻痺又は運動障害が生じる。より具体的には、運動性が損なわれる。従って、ボツリヌス毒素活性自体が簡便かつ適確に判断できる。

【0019】

本発明のトランスジェニックフィッシュとしては、魚類であれば特に限定されないが、飼育がしやすく、1回の産卵数が多い魚類が好ましく、小型の魚類がより好ましく、飼育の容易性から小型の淡水魚が好ましく、特にゼブラフィッシュ、メダカが好ましい。

30

【0020】

本発明のトランスジェニックフィッシュの作製方法は、特に限定されないが、転写制御因子であるGal4をコードする遺伝子と、UAS配列の下流にボツリヌス毒素をコードする遺伝子を組み込んだ融合遺伝子とを導入する方法が好ましく、例えば(a)酵母転写因子Gal4をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックフィッシュ由来の受精卵に、UAS配列の下流にボツリヌス毒素をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを注入する方法；又は(b)酵母転写因子Gal4をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックフィッシュと、UAS配列の下流にボツリヌス毒素をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックフィッシュとを掛けあわせる方法が好ましい。

40

【0021】

Gal4をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックフィッシュは、例えばGenetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish Asakawa, K., Suster, M. L., Mizusawa, K., Nagayoshi, S., Kotani, T., Urasaki, A., Kishimoto, Y., Hibi, M., and Kawakami, K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 1255-1260 (2008) (非特許文献2)に記載してある遺伝子トラップ法

50

及びエンハンサートラップ法により作製できる。

【0022】

一方、U A Sの下流にボツリヌス毒素をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドとしては、例えばトランスポゾン転移ベクター（図1）が挙げられる。このとき、ボツリヌス毒素をコードする遺伝子は、前記のように、フィッシュ型に最適化するのが好ましい。また、遺伝子の発現を確認するために、G F P、R F P等の蛍光蛋白質をコードする遺伝子と同時に組み込んでよい。

【0023】

前記受精卵へのプラスミドの注入は、通常のマイクロインジェクション法により行うのが好ましい。

10

【0024】

また、(b)法に用いるU A S配列の下流にボツリヌス毒素をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックフィッシュは、例えば、前記U A S配列の下流にボツリヌス毒素をコードする遺伝子を組み込んだトランスポゾン転移ベクターを、通常のフィッシュの受精卵に注入することにより作製できる。

【0025】

(b)法における、酵母転写因子G a l 4をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックフィッシュと、U A S配列の下流にボツリヌス毒素をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックフィッシュとのかけあわせは、魚類であるから、体外受精でよい。

20

【0026】

(b)法の場合には、両方のトランスジェニックフィッシュをそれぞれ作製して飼育しておけば、必要に応じて、これらの雄と雌を用いて本発明のボツリヌス毒素遺伝子を発現するフィッシュを作製することができる。

【0027】

作製された本発明のトランスジェニックフィッシュは、胚及び個体においてボツリヌス毒素活性に基づく麻痺や運動障害を生じるので、肉眼で簡便かつ正確に、ボツリヌス毒素活性の有無が確認できる。また魚は、1回の産卵数が多く、マウス等に比べて数多くの実験が可能である。

【0028】

本発明のトランスジェニックフィッシュ又はその胚に、被検物質を作用させ、麻痺又は運動障害の程度を検出すれば、ボツリヌス毒素活性調節剤のスクリーニングが可能である。ここで被検物質は、胚やフィッシュの飼育液に添加すればよく、添加時期は制限されない。麻痺又は運動障害が軽減又は消失する場合には、その被検物質はボツリヌス毒素活性抑制作用を有すると判定できる。一方、麻痺又は運動障害が増強する場合には、その被検物質はボツリヌス毒素活性増強作用を有すると判定できる。

30

【0029】

本発明トランスジェニックフィッシュに導入する遺伝子を、ボツリヌス毒素遺伝子t y p e Bあるいはt y p e Cのアミノ酸を改変することにより、活性が変わった（強くあるいは弱く）ボツリヌス毒素をスクリーニングすることができる。

40

【実施例】

【0030】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明する。

【0031】

実施例1

(1) t y p e A、B、C、Eのl i g h t c h a i nをコードするD N Aを合成した。その際に、ゼブラフィッシュにおいて最大限効率よく翻訳されるように、それら遺伝子のコドンゼブラフィッシュに最適化した。具体的には、配列番号1~4のように改変した。このゼブラフィッシュ最適化ボツリヌス毒素のl i g h t c h a i n遺伝子をG F Pと融合した。これは毒素蛋白質の発現を蛍光で可視化するためである。その融合蛋白

50

質遺伝子を酵母転写因子 Gal 4 の認識配列 (U A S) の下流に組み込んだプラスミドを作製した (図 1) 。

【 0 0 3 2 】

(2) トランスポゾン転移ベクターを用いた、前記の非特許文献 2 に記載の方法により、メスの生殖細胞で Gal 4 を発現するトランスジェニックフィッシュ系統を作製した。この系統のメスをかけあわせて得られる受精卵中には、Gal 4 mRNA 及び蛋白質が存在する。この受精卵に、上記のプラスミドを微量注入した。微量注入された胚や稚魚においては、Gal 4 により U A S 下流につないだゼブラフィッシュに最適化してボツリヌス毒素 G F P 融合遺伝子が発現される (図 2) 。コントロールとしてコドンをも最適化していないボツリヌス菌由来のものをそのまま微量注入した。

10

【 0 0 3 3 】

(3) ゼブラフィッシュ最適化ボツリヌス毒素 G F P 融合遺伝子が発現した胚及び稚魚は麻痺の表現型を示した (図 3 A) 。タイプ A、B、C、E ともにコドンをも細菌型からゼブラフィッシュ型に最適化することにより、ゼブラフィッシュ胚及び稚魚における発現が増加した (図 3 B 中の緑色のバー) 。また、type B と type C が、非常に有効で、強く麻痺及び運動障害を引き起こすことを発見した (図 3 B 中の黒いバー) 。

【 0 0 3 4 】

実施例 2

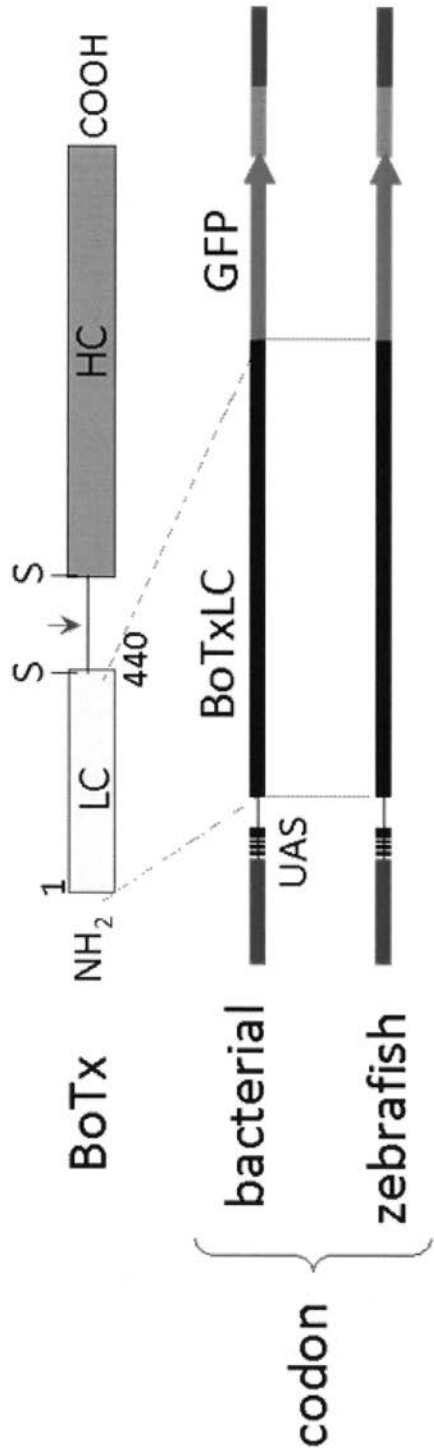
上述の方法では、その都度、プラスミド DNA の受精卵への微量注入を必要とする。ゼブラフィッシュ受精卵への微量注入は習熟した者ならば、1日に数百個の受精卵に行うことは可能であるが、それでもある程度の労力を必要とする。この問題を回避するために、上述の改変型 type B あるいは type C 遺伝子を、ゲノムに組み込んだトランスジェニックフィッシュを、A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. Kawakami, K., Takeda, H., Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N., and Mishina, M. Developmental Cell 7, 133-144 (2004) に記載のトランスポゾン転移ベクターを用いる方法で作製した。同時に、神経細胞において Gal 4 を発現するトランスジェニックフィッシュ系統を、トランスポゾン転移ベクターを用いた、前記の非特許文献 2 に記載の方法で作製した (図 4 : Gal 4 - delta A、Gal 4 - 233 A、Gal 4 - 81 B、Gal 4 - 164 B、Gal 4 - 155 A、Gal 4 - 39 A) 。これら Gal 4 発現系統と U A S の下流に改変型 type B あるいは type C 遺伝子を組み込んだトランスジェニックフィッシュ系統をかけあわせて得られた胚あるいは稚魚において神経特異的にゼブラフィッシュ最適化ボツリヌス毒素が発現される (図 5) 。

20

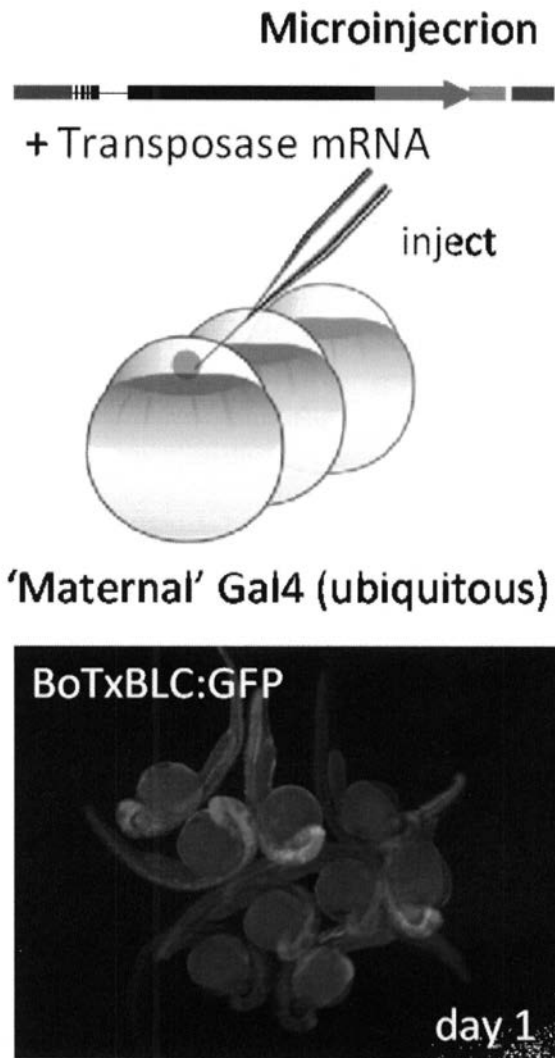
30

図 6 は、二重トランスジェニック胚における運動障害、麻痺の表現型を示す。異なる Gal 4 発現トランスジェニックフィッシュ系統とかけあわせることにより、さまざまな程度の運動障害、麻痺の表現型が観察されることを見いだした。

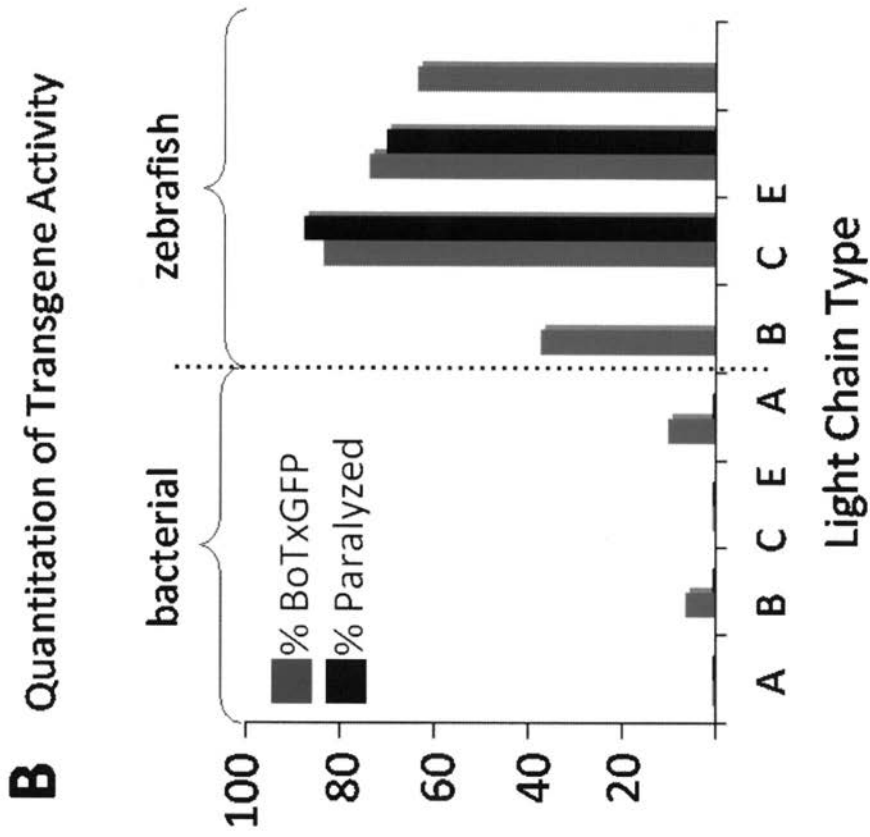
【 図 1 】



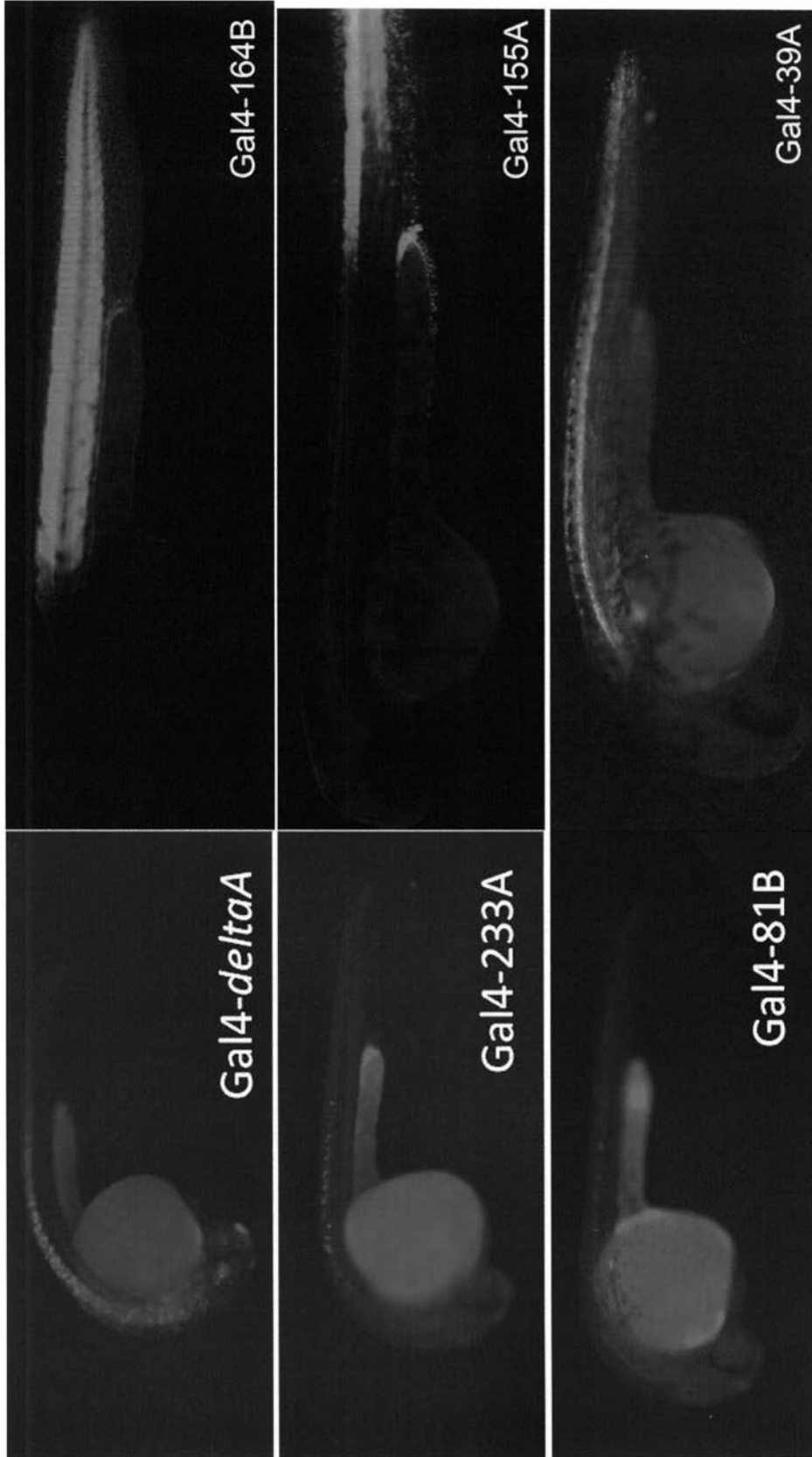
【 2 】



【 3 】



【 図 4 】



【 5 】

Gal4 Driver



UAS:BoTxBLC:GFP



Gal4



UAS



BoTxBLC GFP



【 図 6 】



【 配列表 】

000552768400001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100111028

弁理士 山本 博人

(72)発明者 川上 浩一

静岡県三島市谷田1111番地 国立遺伝学研究所内

(72)発明者 サスター, マキシミアノ

静岡県三島市谷田1111番地 国立遺伝学研究所内

審査官 三原 健治

(56)参考文献 Toxicol.Lett.,Vol.189S(Sept.13,2009)p.S89(V76)

細胞工学,Vol.28,No.6(May 2009)p.586-591

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

A01K 67/027

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S / W P I X (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)