

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590188

研究課題名（和文）トランスポゾンを用いた発生後期鶏胚への遺伝子導入

研究課題名（英文）Gene transfer to the chick during later embryonic development using transposon

研究代表者

佐藤 昇（SATO NOBORU）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00254756

研究成果の概要（和文）：本研究はトランスポゾンという遺伝子組み換え時に認められる構造を用いた遺伝子導入が発生後期のニワトリ胚でどれだけ有用かを検討したものである。この研究でトランスポゾンを用いて遺伝子発現ユニットを導入した場合、発生後期までの長期間にわたって遺伝子導入が可能となる可能性が示された。一方で目的とする細胞・組織に導入するには遺伝子発現ユニットの正確な構築が必要であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：This study is planned to clear how transposon-mediated gene transfer does work in the chicken embryo during the later period of development. It is shown that transposon-mediated gene transfer allows efficient delivery of the transgene into the chicken embryo until the later period of development. It is also suggested that the gene expression cassette should be precisely constructed to introduce the transgene into the specific cell and tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：解剖学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：ニワトリ胚、遺伝子導入、トランスポゾン

1. 研究開始当初の背景

実験モデル動物としてのニワトリ胚は安価で胚操作に優れており、古くから脊椎動物の発生研究に用いられてきた。また最近では発生研究のみならず、癌の転移や浸潤のメカニズムを明らかにするためのモデルとしても用いられている。しかしながらゼブラフィッシュやマウスと比較して遺伝子操作に難があり分子生物学的手法が用いにくいという欠点がある。その利用を限られたものにしてき

た。この問題を解決するために、近年我々を含む多くのグループによって遺伝子導入技術が改良され、発育鶏胚は分子の生体での機能を安価・簡便・スピーディーに評価できるモデルとして進化している。例えば我々は、発生の比較的初期の段階において細胞特異的（脊髄運動ニューロン）且つ任意のタイミングで発育鶏胚に遺伝子を導入することが可能であることを示すことに成功してきた。しかしながら発生の後期や孵化後につい

ては未だに再現性・信用性が高い遺伝子導入法が確立しておらず、その時期の生命現象の解析に用いることを難しくしているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では Tol2 トランスポゾンを用いた遺伝子導入の系を検討することで、発生後期や孵化後の鶏での生命現象の解析における可能性・優位性を検証することを目的とする。具体的な焦点を我々が今まで解析に注力してきた脊髄運動ニューロンとその標的筋の形成に絞り、以下の点に関して研究を推進する。

(1) 脊髄運動ニューロン、シュワン細胞、骨格筋細胞で遺伝子導入するための特異的エンハンサー領域及びプロモーター配列の選択と検討を行う。

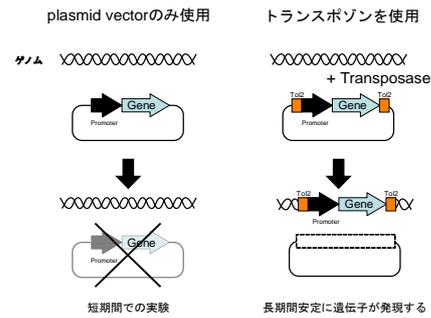
(2) それぞれの組織を異なる蛍光蛋白で標識し、運動ニューロンとシュワン細胞、運動ニューロンと骨格筋、あるいは三者による神経筋接合部の発達などを検討する。

3. 研究の方法

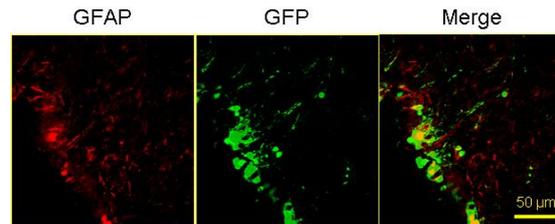
鶏胚の発生後期あるいは孵化後に効率よく遺伝子を導入するために、運動ニューロン・シュワン細胞・骨格筋の発達する時期に機能するそれぞれの転写調節領域を単離する。次にその転写調節領域によって蛍光蛋白を発現する遺伝子断片を Tol2 トランスポゾンではさんだコンストラクトを作製する。作製された Tol2 トランスポゾンのコンストラクトを初期鶏胚に遺伝子導入し、発生後期鶏胚～孵化後のひよこでレポーター遺伝子の発現を運動ニューロン、シュワン細胞、骨格筋細胞で検討する。またそれら二者あるいは三者の挙動をモーターユニットの形成という観点から評価することで本手法の有用性を検討する。本研究は私の他に二人の連携研究者が分子生物学的研究および形態学的研究のそれぞれの専門分野からサポートすることで推進される。

4. 研究成果

(1) 脊椎動物の初期の発生を解析するための理想的なモデルである発育鶏胚において、発生の後期や孵化後についての種々の現象を解析するモデルとしての有用性を再検討するにあたり、Tol2 トランスポゾンを用いた遺伝子導入系の検討を行った。まずアストログリアへの特異的遺伝子導入に良く用いられる GFAP プロモーターで作動する Tol2 トランスポゾン GFP 発現ベクターを設計、作成した (次図参照)。

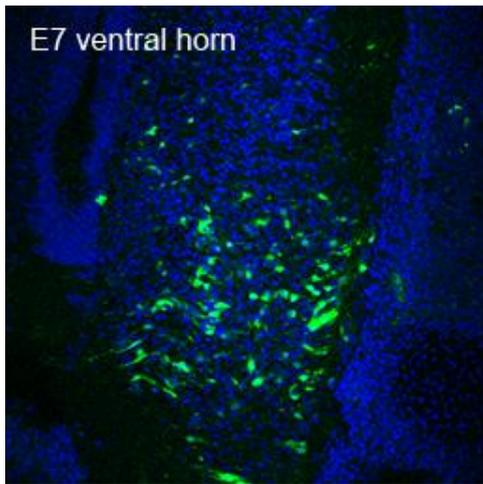


これを初期胚の様々な神経形成領域に導入し、後期胚での発現様式を観察した。その結果、孵卵開始から 10 日過ぎ～孵化後のヒナにおいて脳や脊髄など様々な神経組織において GFP を発現する細胞が認められた。これらの GFP 陽性細胞の性格を確認するために GFAP に対する免疫組織化学反応を行ったところ、内在性の GFAP の発現が一致して認められ、アストログリアへの遺伝子導入を確認することに成功した (下図参照)。

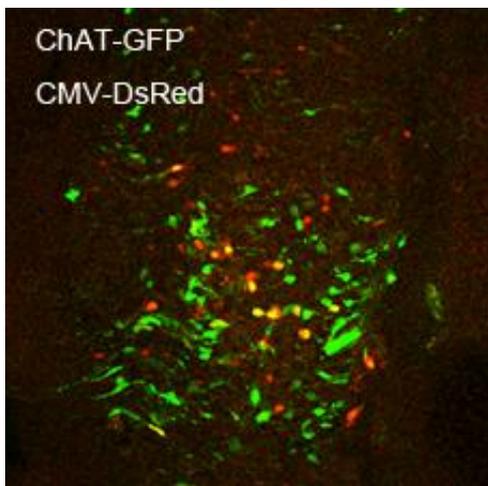


この方法により、孵化後の「ひよこ」においても脳や脊髄に GFP で標識されるアストログリアが多数観察された。

(2) 続いて脊髄運動ニューロン特異的に遺伝子導入するためにコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) のプロモーターを含むと想定される領域を検索した。マウスや人の遺伝子情報からニワトリの ChAT 遺伝子領域と思われるところを同定し、ニワトリの BAC ライブラリーから 10K 程度と同領域を回収した。最初のメチオニン (ATG) に相当する領域がはっきり特定できず、最も近いと思われる部位に GFP レポーター遺伝子を連結し、Tol2 トランスポゾン GFP 発現ベクターの作成を行った。孵卵開始 3 日の胚に遺伝子導入し、7 日目に脊髄横断切片を観察したところ前角に GFP 陽性細胞が認められた (次図参照)。



これら GFP 陽性細胞は ChAT を発現する脊髄運動ニューロンであることが想定された。異なる転写調節領域を用いて比較検討するため、構成的発現を目的とした EF-1 や CMV などのプロモータと、GFP や DsRed などの異なる蛍光タンパクレポーター遺伝子の組み合わせで T2 トランスポゾン発現ベクターを作成した。これらを ChAT プロモータで作動する Tol2 トランスポゾン発現ベクターと同時に遺伝子導入した場合、それぞれの発現ベクターで遺伝子導入される細胞は異なったものになることが確認され、単離された ChAT プロモータは運動ニューロンへ遺伝子導入するのに優位であることが明らかになった(下図参照)。



(3) 次に ChAT プロモータで遺伝子導入される GFP 陽性細胞を発生にしたがって追跡したところ、14 日目～孵化後のヒナでは脊髄前角で GFP を発現する細胞が確認できなかった。この結果は、ニワトリ BAC ライブラリーから単離した ChAT プロモータは 7 日目では前角の運動ニューロンで機能していることを意味する。一方、本来発

生の後期では ChAT プロモータはより活性を有することが期待されるが、T2 トランスポゾン発現ベクターと組み合わせるとあまり有効に機能していないことを示唆する結果が得られた。

(4) 上記の結果を検証するために Tol2 トランスポゾンに依らない通常のプラスミドベクターで転写調節領域を機能させた場合と比較を行った。脊髄運動ニューロンに優位に発現する Lim ホメオ蛋白の一つである islet-1 遺伝子のエンハンサー領域を用いて T2 トランスポゾン発現ベクターを作成し、その遺伝子導入について検討した。ChAT プロモータを有する発現ベクターと同様に遺伝子導入操作を行ったところ、遺伝子導入直後 (E5~E6) は前角の運動ニューロンに GFP が発現するのが確認されたが、さらに後期胚 (E8~E10) では前角以外の脊髄内の細胞に広範に GFP の発現が認められた。これは同転写調節領域を単純な発現ベクターを用いて遺伝子導入した場合と異なる結果であった。

(5) これらの結果と ChAT プロモータで得られた結果と合わせて考えると、T2 トランスポゾンに組み込むことで発現強度や特異性などのエンハンサー、プロモータ活性が DNA 断片によってまちまちであることが推察された。本研究によってトランスポゾンを用いた遺伝子導入により、今まで困難であった発生後期あるいは孵化後のニワトリに長期的な遺伝子導入が可能であることが示された。またこの場合、導入遺伝子の転写を調節する遺伝子領域の設計等が重要であり、標的により効果的な遺伝子配列を検索し組み込む必要があることが明らかになった。

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 5 件)

- ① Kobayashi N, Homma S, Okada T, Masuda T, Sato N, Nishiyama K, Sakuma C, Shimada T, Yaginuma H. Elucidation of target muscle and detailed development of dorsal motor neurons in chick embryo spinal cord, J Comp Neurol, 査読有、印刷中
- ② 佐藤 晃, 柴田昌弘, 安戸方邦, 伊藤健二郎、脊髄運動ニューロンの発生と細胞死：その標的との関連、新潟医学雑誌、査読有、第 126 巻、2012、233-237
- ③ Shimada T, Yaginuma H, Sato N,

Homma S. Neurogenin2 expression together with NeuroM regulates GDNF family neurotrophic factor receptor $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$) expression in the embryonic spinal cord. Dev Biol、査読有、320 巻、2012、250-63、

- ④ T Matsuo, K Kawasaki, Osada, H Sawahata, T Suzuki, M Shibata, N Miyakawa, K Nakahara, A Iijima, N Sato, K Kawai, N Saito, I Hasegawa、Intrasulcal electrocorticography in macaque monkeys with minimally invasive neurosurgical protocols、Front Syst Neurosci、査読有、5 巻、2011、34
DOI: 10.3389/fnsys.2011.00034
- ⑤ Y Yamazaki, M Shibata, T Ushiki, K Isokawa, N Sato、Bilateral, asymmetric anomalies of the anterior bellies of digastric muscles、Journal of Oral Sci、査読有、53 (4) 巻、2011、523-7

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① 千葉映奈、長島寛、柴田昌弘、佐藤昇、シナプス形成期運動ニューロンへの遺伝子導入法の検討、2013 年 3 月 30 日、第 118 回日本解剖学会全国学術集会、高松市
- ② Sato N, Nakayama H, Shibata M, Yasudo M, Ito K, Uemura O, Okamoto H. Development of a novel model for polyglutamine pathogenesis using the chicken embryo. 8th FENS Forum of Neuroscience, 2012 年 7 月 15 日、バルセロナ (スペイン)
- ③ 斎藤大樹、柴田昌弘、伊藤健二郎、植村修、岡本仁、佐藤昇、Gene delivery into developing neurons in the chick using Tol2 transposition、2011 年 3 月 28 日—30 日、第 116 回日本解剖学会全国学術集会、横浜市
- ④ 柴田昌弘、伊藤健二郎、佐藤昇、In vivo imaging of the chick using tol2 transposition、2011 年 3 月 30 日、第 116 回日本解剖学会全国学術集会、横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 昇 (SATO NOBORU)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：00254756

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

柴田 昌弘 (SIBATA MASAHIRO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：10343253