

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15020

研究課題名(和文) エレクトロポレーション法による時間・空間特異的な遺伝子発現制御系の確立

研究課題名(英文) Spatiotemporal in vivo gene regulation using the electroporation technique

研究代表者

人見 次郎 (Hitomi, Jiro)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：00218728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：初期胚の血管系は血流の有無に関わらず、段階的に形成されていく。このメカニズムの解明には、血管形成に係る特定遺伝子の発現を時間空間的に制御できる手法が必要である。本研究では、デュアルパルスエレクトロポレーション(DP)と導入遺伝子の特性に注目し、系の樹立を試みた。試行錯誤の結果、全身性にGal4蛋白質を発現させたTg(bactin2:GFF)を用意し、任意の領域にUAS:EGFP pAのベクターを注入、DPにより遺伝子導入する系を構築した。この系では、遺伝子を注入した任意の領域でEGFPの発現が確認され、発現誘導が証明された。今後は細部の改善を加え、より高精度な時間空間特異性の実現を図る。

研究成果の概要(英文)：We had succeeded in clarifying that the formation of the vascular system of the brain is stepwisely performed in zebrafish during early ontogeny even without the blood flow. To elucidate the regulatory mechanisms, the genes spatiotemporal regulation sytem is necessary, so we challenged to establish the new method for in vivo using a dual pulse electroporation. Firstly, we established a new transgenic zebrafish line Tg(bactin2:GFF), in which Gal4 protein was expressed in the whole embryo. We injected the UAS:EGFP pA plasmid into anywhere in the cranial region of the 2dpf embryo, and then applied the pulse electric potential. As a result, the EGFP expression was observed in the head ubiquitously, that is, we succeeded in controlling the in vivo gene expression spatiotemporally. In future, we will improve the applying the pulse electric potential and achieve higher definitive gene introduction.

研究分野：解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：遺伝子導入 エレクトロポレーション ゼブラフィッシュ Gal4-UAS 脈管形成 血管新生

1. 研究開始当初の背景

血管系の初期発生過程に関しては、未分化な血管網の中から血流によって動・静脈が選択されるというネットワークモデルが、初期の血管形態形成ならびに動静脈分化を決するメカニズムとして信じられてきた。

しかし我々は、全発生過程が顕微鏡下で観察可能なゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) をタイムラプス観察することでこの過程を詳細に明らかにし、その結果 初期の血管形成ではネットワークモデルは当てはまらないこと、すなわち頭部においては、独立した動脈性と静脈性の二つの血管床がまず形成され、そこからの血管新生により脳血管系が構築されること、血管網と血流に依存した形態形成が認められないことを明らかにした。さらに *silent heart* 遺伝子を抑制した血流を生じない胚の観察からも、初期の脳血管系の形成に血流が必要ないことを明らかにした。以上の結果は、ネットワークモデルが胚体内の初期血管系の形成過程には当てはまらず、遺伝的な制御機構が存在することを示唆している。

すなわち、少なくとも初期血管系の形成過程は、段階的であり、血流の有無に関わらず、特定部位で特定の時間に変遷し、血管網の基本的なフレームを作り上げていく。そしてこの段階的な血管系形成メカニズム解明のためには、時間空間的に制御された遺伝子発現系の構築が有用であり、木村が中心となり、赤外レーザーを使用した IR-LEGO 顕微鏡による 1 細胞レベルでの血管内皮細胞における遺伝子発現制御法を確立した (Kimura et al., ATVB 33:1264-70, 2013)。

しかしこの方法では、同一組織の複数の細胞で、同時に遺伝子発現制御を行うことは困難であり、また対象遺伝子ごとに遺伝子組み換え体の系統の樹立が必要となるなどの問題が残されており、より簡便な時間空間的な遺伝子制御法が望まれた。

2. 研究の目的

我々は初期の血管系の形成過程の詳細を形態学的に明らかにしており、本研究の目的は、そのメカニズム解明のための手法の確立である。

ゼブラフィッシュ胚の体幹部においては、血管形成に関与する分子機構がいくつか報告されてきているが、体幹部に比べて複雑な形態を示す脳血管系に関しては、そのメカニズムは全く知られていない。この状態を打破するためには、時間・空間特異的に個体内で遺伝子を操作する方法手法の開発は必須である。そこで本研究では、ゼブラフィッシュ初期胚を対象にこれらの細胞集団や周囲組織へのエレクトロポレーション法を利用した遺伝子導入系を確立し、時間・空間特異的な特定遺伝子の *in vivo* 機能解析を行い、脳血管系形成メカニズムの解明を行うための基盤技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、エレクトロポレーション法を利用して 脳血管系形成を担う血管芽細胞集団や周囲組織を対象に、任意の発生段階で、それら細胞集団の存在領域へ、核酸分子をインジェクションし、高効率に細胞内に導入することで、核酸分子上の遺伝子の発現を時間空間特異的に制御する系の確立を試みた。

ゼブラフィッシュ胚へのエレクトロポレーション法は、これまで主に神経組織を対象にいくつか報告がなされているが (Cerda et al., *Method* 39:207-211, 2006; Kera et al., *Zebrafish* 7:97-108, 2010)、導入効率や生存率、局所性などの面で改善すべき課題は多く残っている。

本研究では、使用する電極を工夫することでこれらの問題点の改善を目指した。すなわち、野生型の胚は 1% 低融点アガロースに包埋し、標的となる細胞群の存在領域へインジェクション用のガラス針を差し込み、マイナス極のタングステン電極をガラス針の中に差し入れ、プラス極の電極はサンプルを包埋したゲルの下層にシート状に設置する。この状態で微量の核酸溶液をインジェクションし、その後速やかに電流刺激を加える。電流は、マイナス極からプラス極へと流れるので、標的細胞群とマイナス極の間に核酸溶液をインジェクションする (図 1 参照)。

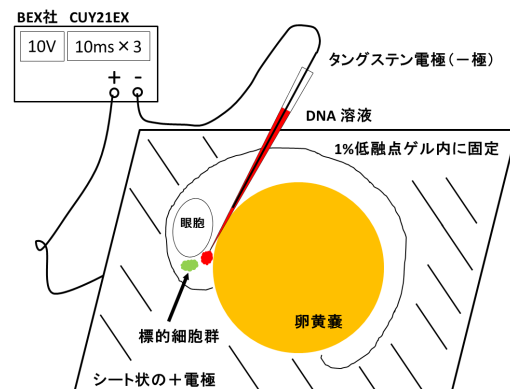


図1:当初計画したエレクトロポレーション法のイメージ

また、従来のエレクトロポレーション法では、細胞膜に微細孔を空けるポレーションパルス (PP) と、細胞内に核酸を送り込むドライビングパルス (DP) が同じで、電流を流した際に個体の受けるダメージが大きな問題であり、PP と DP の出力を工夫する必要があった。一方、デュアル方式エレクトロポレーションでは、電圧を変えて出力することができ、この問題を大きく改善する可能性があった (図 2 参照)。

すなわち、デュアル方式のエレクトロポレーション法では、高電圧が必要な PP に比べて、DP は低い電圧で十分であるが、従来の短形波のエレクトロポレーターではこれらを分けることができず、必要以上の電氣的な負荷が組織にかかり、そのダメージが実験効率に大きな影響を与えていた可能性が高い。

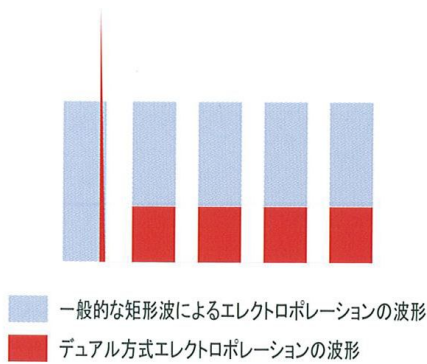


図2 矩形波方式とデュアル式の比較
(Bex 社カタログより転載)

4. 研究成果

(1) エレクトロポレーション法による効率的な遺伝子導入条件の検討

効率的な遺伝子導入条件を検討するために、まず受精後2日目の野生型のゼブラフィッシュを用いて条件検討を行った。

導入するベクターには、全細胞での発現誘導が可能な *beta actin 2 (bact in2)* 遺伝子プロモーターを使用した DNA コンストラクト *bact in2:EGFP pA* を作成して使用した。このベクターを使用することで、遺伝子導入に成功した細胞では緑色蛍光が発現する。すなわち蛍光の発現によって、実験の成否が確認できる系を用いて、エレクトロポレーション法の遺伝子導入の際に最適な電圧と付加時間の条件検討を行った。

結果、様々な条件を試みたが、緑色蛍光を確認することはできなかった。当初の計画で、ガラスキャピラリーに電極を挿入する方法を採用したが、これが原因で流れる電流値が十分得られていない可能性が想定されたため、途中から通常のタングステン電極を用いた方法へ変更した。すなわち、プラス極とマイナス極の2本の電極を用意し、その間に DNA 溶液をインジェクションする方法に変更した(図3参照)。

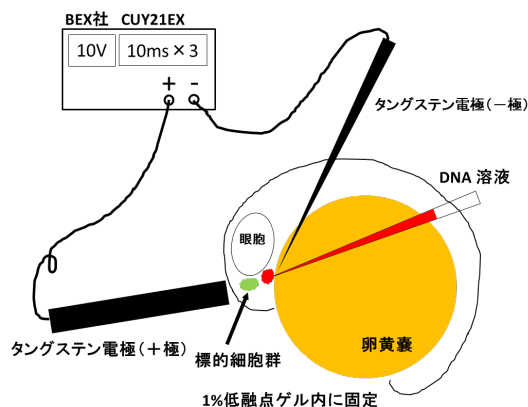


図4 変更後のエレクトロポレーション法のイメージ

この方法では個体を焼失するほどの電流を流すことが可能であるが、エレクトロポレーション後の胚の生存の限界まで電圧等の条件を厳しくして遺伝子の導入を試みたが、

いずれの条件でも蛍光を確認することはできなかった。

(2) Gal4-UAS システムを用いた遺伝子導入系の樹立

エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入は、これまで主にニワトリ胚で頻繁に用いられ数多くの実績が報告されてきた。近年では iPS 細胞に対しても使用されるようになってきているが、我々はゼブラフィッシュの系で様々な条件検討を行ったもの成果を得ることができなかった。そこで、ゼブラフィッシュ以外の生物で使用実績のある研究者とディスカッションを行い、我々の実験系の問題点を探索し改善を試みた。その結果、導入するベクターのサイズを全体として 5kbp 以下に抑えることが、遺伝子導入を高効率で成功させる上で非常に重要な要素であることが判明した。

しかしながら、組織特異的な発現制御を想定した場合、使用するプロモーターの多くは 5-8kb 必要となり、このベクターのサイズ制限により実験系が将来かなりの制約を受ける。そこで我々は、当初の遺伝子導入のコンストラクトの設計を変更し、遺伝子導入系に新たに Gal4-UAS システムを導入することとした。すなわちあらかじめ特定組織で Gal4 蛋白質を発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュを作成し、この系統の胚に、*UAS:EGFP pA* のベクターを導入する実験系を構築した。この方法では、Gal4 蛋白質の発現組織に遺伝子発現が限定され、かつ導入するベクターで使用するプロモーターも 500bp 程度に抑えることが可能となる。まず遺伝子導入の条件検討をするために、全身で Gal4 蛋白質を発現する *Tg(bact in2:GFF)* の系統を新たに樹立した。この系統では、全身の細胞で Gal4 蛋白質の改変体である GFF が発現しているため、*UAS:EGFP pA* のベクターが導入された全ての細胞で緑色蛍光が発現し遺伝子導入の成否を評価できる。

結果、頭部組織に緑色蛍光を確認し、エレクトロポレーションを用いた時間空間的な遺伝子発現制御系を樹立することに成功した(図5参照)。

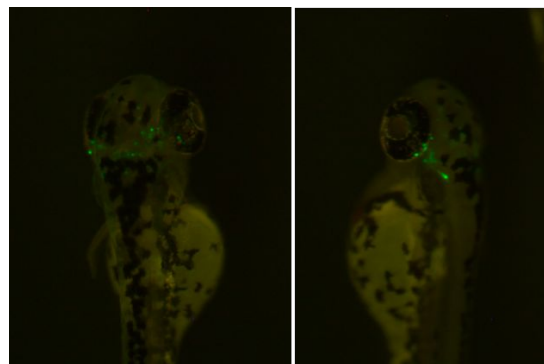


図5 時間空間的に恣意的な頭部組織への遺伝子導入とその発現

遺伝子導入のための電圧条件としては、Pp 100V/0.1msec; Pd 10V/50msec × 5 回(100msec の interval)で高効率での遺伝子導入を達成できることが判明した。

しかしながら現状では遺伝子の導入部位に十分な局所性を持たせるには至っていない。今後は当初予定していたキャピラリー内に電極を入れた方法(図1参照)での条件検討を進めていき、より局所性を高めるための改善を進めていく必要がある。また組織特異性を検証するため、血管特異的、あるいは神経組織特異的なGFF発現組み換え体を作成し、より高精細な時間空間的な遺伝子導入系の確立を目指していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Hashiura T, Kimura E(他4名、2番目), Hitomi J(他4名、7番目): Live imaging of primary ocular vasculature formation in zebrafish. PLoS One. 26;12(4). 2017. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0176456.

Kimura E, Isogai S, Hitomi J: Integration of vascular systems between the brain and spinal cord in zebrafish. Dev Biol. 1;406(1):40-51. 2015. 査読有
DOI:10.1016/j.ydbio.2015.07.015.

Kitazawa T, Hitomi J(他12名、11番目): Developmental genetic bases behind the independent origin of the tympanic membrane in mammals and diapsids. Nat Commun. 22;6:6853. 2015. 査読有
DOI:10.1038/ncomms7853.

〔学会発表〕(計3件)

Kimura E, Isogai S, Hitomi J: Vascular morphogenesis between the brain and spinal cord in zebrafish. 第38回日本分子生物学会年会. 2015年12月. 兵庫

木村英二、磯貝純夫、人見次郎: 脳底-椎骨動脈系の形成過程. 第23回日本血管生物医学学会学術集会. 2015年12月. 兵庫.

橋浦哲哉、木村英二、藤澤志津子、及川里百合、黒坂大次郎、人見次郎: 眼の初期血管系の形成過程. 日本解剖学会第61回東北・北海道連合支部学術集会. 2015年8月. 盛岡.

〔図書〕(計0)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

人見 次郎 (HITOMI, Jiro)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00218728

(2)研究分担者

木村 英二 (KIMURA, Eiji)
岩手医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50405750