

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590192

研究課題名 (和文) 発生運動ニューロンの時間的・空間的に特異的な標識法の検討

研究課題名 (英文) Study of temporal and spatial labeling of developing motoneurons

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：本研究においては、レポーター遺伝子を運動ニューロン特異的エンハンサー・プロモーター領域に連結した遺伝子を発育鶏胚に導入することで、発生運動ニューロンの標識を行うことを検討した。その結果、GFP やアルカリフォスファターゼなどのレポーター遺伝子を用いることで、体性運動ニューロンの神経線維がその伸長し始める時期から明瞭に発育鶏胚で標識されることが明らかになった。また、時間経過を追うことで、脊髄神経叢の形成過程を観察することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：解剖学

科研費の分科・細目：解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：運動ニューロン、ニワトリ胚、生体エレクトロポレーション法、遺伝子導入

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。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ためその利用を限られたものにしてきた。この問題を解決すべく我々はこれまでニワトリ胚に対して様々なアプローチで遺伝子導入を試みてきた。

具体的には、(1) ニワトリ胚腰髄からの初代培養運動ニューロンに対してアデノウ

イルスベクターによる遺伝子導入法を用いて、Bcl-2 遺伝子が運動ニューロンを細胞死から防御することを示すことに成功した (Sato N et al. *Mol Cell Neurosci.* 1998)。

また、(2) 増殖型トリレトロウイルスベクター RCASBP を用いる遺伝子導入によって、Bcl-2 や Bax をニワトリ胚へ導入してその働きを解析することに成功した (Sato N. et al. *J Neurobiol.* 2002, Sato N. et al. *Cell Death Differ.* 2006)。さらに同類である RCANBP レトロウイルスベクターを用いて内部プロモーターによる遺伝子発現を制御する系の検討を重ねてきた。

その結果、(3) CMV プロモーターを内部プロモーターとして用いることで遺伝子発現に組織・細胞特異性が認められること、テトラサイクリン反応領域を用いることで、鳥類で初めてドキシサイクリン投与による遺伝子発現が誘導される Tet-on の系を構築すること、に成功した (Sato N. et al. *J Virol.* 2002)。

最近では、(4) ニワトリ胚での in ovo electroporation 法と Tet-on システムを組み合わせたドキシサイクリン投与による脊髄運動ニューロン特異的且つ特定のタイミングで遺伝子発現を誘導できる系を確立することに成功した (Sato N. et al. *Cell Death Differ.* 2006)。

これらの研究の積み重ねによって我々は、発育鶏胚においてある程度運動ニューロンを任意のタイミングで標識することが可能であることを示すことに成功してきた。

古典的なニューロンの標識とは異なって、生きているニューロンの時間的・空間的に狙いを定めた標識は未だに困難な技術であるが、可能となればその価値は大きい。我々が今まで進めてきた研究をさらに推進することで解決の糸口を見出すべく、本研究に着手することとした。

2. 研究の目的

脊髄前角の運動ニューロンは、その前角内での配置や、投射経路および標的 (筋肉) などの解剖学的構造が発生過程での転写因子の発現パターンによって決定されていることが明らかになってきている。すなわち運動ニューロンの産生・分化の過程で Lim-HD 転写因子群に代表される転写因子らの発現惹起・抑制の組み合わせによって運動ニューロンのサブグループが形成されていくと思われる。したがって運動ニューロンの形成過程を理解する上で、(1) 運動ニューロンのサブグループ単位あるいは個別運動ニューロン単位で、且つ (2) 発生の時間軸の中で特定のタイミングで、運動ニューロンを標識することができれば大変有益である。そこで本研究課題は、実験モデル動物としてニワトリ胚を用い、遺伝子導入法を駆使して特定の運動ニューロン領域あるいはサブグループを特定任意のタイミングで標識する手法を検討していくことを目的とする。

本研究では今まで築いてきた手法をもとにさらに有用性の高い、時間的・空間的に特異的な運動ニューロン標識法の検討を行う予定であるが、当該研究期間は特に以下の点に注力して研究を進めることとする。

(1) 運動ニューロン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

(2) 運動ニューロン標識のための各種レポーター遺伝子の検討

3. 研究の方法

(1) 運動ニューロンに特異的なエンハンサーの検討

運動ニューロンで発現する転写因子 HB9 や Islet-1 の遺伝子から様々に単離して検討してみる。HB9 に関しては 5' 側上流約 9kb のプロモーター・エンハンサー領域を用いて運動ニューロン特異的遺伝子導入に成功している (Sato et al. *Cell Death Differ.* 2006)。さらなる導入効率向上の鍵の一つはコンストラクトのサイズの縮小とエンハンサー領域の濃縮にあると考えており、この約 9kb の領域からエンハンサーとして十分に機能する領域を単離する。

(2) プロモーター配列の検討

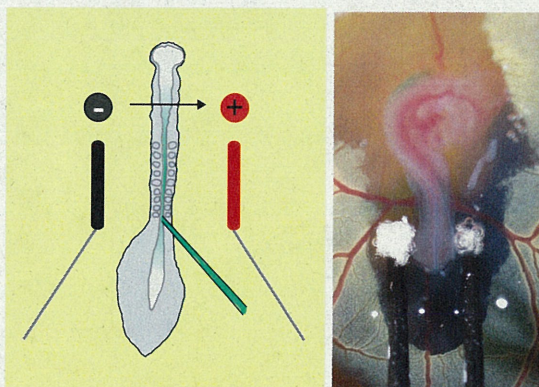
House-keeping gene (HSP やアクチン) のプロモーターや上記 HB9 や Islet-1 遺伝子のプロモーター部分を比較検討してみる。特に CMV エンハンサーとアクチンプロモーターの合成である CAG プロモーターは強力な働きを示すが (Sato N et al. *Mol Cell Neurosci.* 1998)、このアクチンプロモーター部分と運動ニューロン特異的エンハンサーを連結することによってより効率のよい系になりうるかを検討していく。

(3) レポーター遺伝子の検討

GFP とその変異体、lacZ やアルカリフォスファターゼ (AP) などのレポーター遺伝子を比較検討してみる。

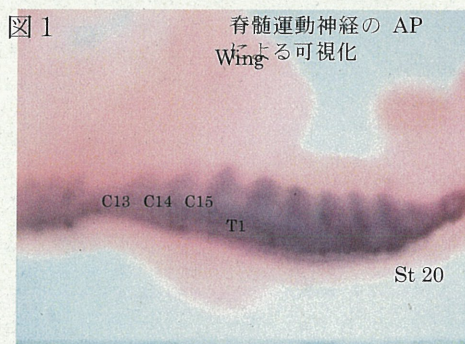
上記検討項目に対応するプラスミドを作成し、ニワトリ胚に生体エレクトロポレーション法によって導入する (下図参照)。その後胚を適当な時期で処理して、凍結切片を作成して運動ニューロンマーカーで免疫染色して GFP の発現パターンを観察して評価する。あるいは無固定のまま運動ニューロンの軸索伸展パターンを蛍光実体顕微鏡下で観察する。またエンハンサー及びプロモーターの調節領域に rITA を連結したコンストラクトも作成して、ドキシサイクリン投与による遺伝子発現誘導を行って時間特異性についても検討を加える。

In ovo electroporation法による 発育鶏胚の神経管への遺伝子導入



4. 研究成果

運動ニューロン特異的発現を誘導するためのエンハンサー・プロモーター領域として *islet-1* や *HB9* 遺伝子の転写調節領域をレポーター遺伝子 (GFP 及びアルカリフォスファターゼ) に連結した発現ベクターを用いて、これらのコンストラクトを孵卵開始 2.5~3.5 日 (ステージ 14~18 前後) の鶏胚神経管へ注入して生体エレクトロポレーション法による遺伝子導入を行い、その後胚の発育を続け、孵卵開始 3~6 日 (ステージ 19~28 前後) ほどで解析を進めた。その結果、緑色蛍光蛋白 (GFP) 及びアルカリフォスファターゼ (AP) のいずれのレポーター遺伝子を用いても体性運動ニューロンの神経線維がその伸長し始める時期からはっきりと発育鶏胚で標識される条件を決めることに成功した (図 1 参照)。



そこで本手法を用いた運動ニューロンの標識を基に発育鶏胚での腕神経叢の形成過程を解析した。鶏の腕神経叢は C13-T1 の 4 分節で構成されるが、C15 を中心として、Stage 21 から腕神経叢の形成が始まり (図 2)、Stage 23 において完成することが確認された (図 3)。

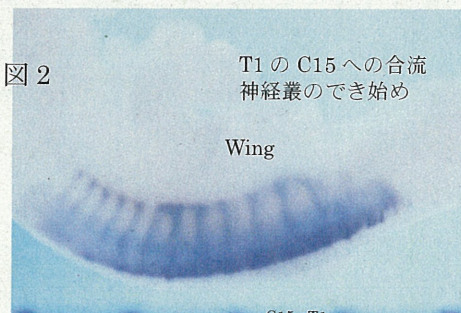


図 3

C13 の神経叢への合流
神経叢の完成

Stage 24 以後は、完成した神経叢から、神経芽 (軸索) が正中神経として末梢へ向かって伸長して行く様子も明らかになった (図 4)。

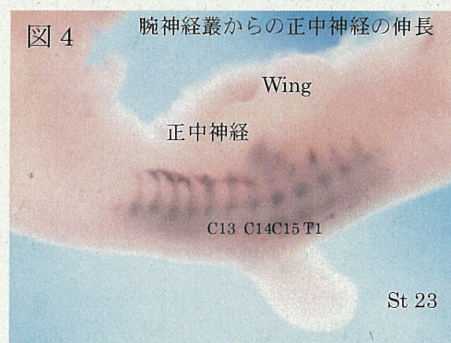


図 4

腕神経叢からの正中神経の伸長

このように本手法を用いることで、脊髄運動ニューロンの発生過程を経時的に観察できることが明らかになった。運動ニューロンの形成は、最終的に標的となる筋が分化して、運動ニューロン終末の形成と再構築が終了する時点で完成する。今後は本研究で用いたプロモーターが発生後期のどの時期まで有用であるか決定し、運動ニューロンの回路形成が完成する時期まで経過を追えるような系の完成を目指す予定である。また本研究の結果を単に運動ニューロンを標識して発生過程を可視化するための手法に留めず、機能分子などを導入することにより、運動ニューロンの回路形成の分子メカニズムを明らかにするような研究に応用していく予定である。

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 2件)

1. 「発生脊髄運動ニューロンをラベルする」
佐藤昇、新潟医学雑誌 印刷中 査読無

2. 「Temporal regulation of transgene expression in the chick embryo with the *tet* regulatory system」 N. Sato, *Acta Med. Biol.* In press. 査読無

〔学会発表〕(計 2件)

「ニワトリ胚での発生運動ニューロンの標識」佐藤昇、宮脇誠、鈴木了、第113回日本解剖学会・全国学術集会(大分)平成20年3月29日

「ニワトリ胚における体性運動ニューロンの観察」宮脇誠、柴田昌宏、佐藤昇、第114回日本解剖学会・全国学術集会(岡山)平成21年3月30日

〔図書〕(計 0件)
なし

〔産業財産権〕
○出願状況(計 0件)
なし

○取得状況(計 0件)
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 昇 (SATOU 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

宮脇 誠 (MIYAWAKI MAKOTO)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 40293211

鈴木 了 (SUZUKI RYOU)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 30313513