

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19770191

研究課題名（和文） 両生類における遺伝子ターゲティング法の開発

研究課題名（英文） Study on gene targeting in amphibian

研究代表者

小沼 泰子（ONUMA YASUKO）

独立行政法人産業技術総合研究所 器官発生工学研究ラボ 研究員

研究者番号：90431824

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生・分化、動物、遺伝学、細胞・組織、両生類

1. 研究計画の概要

この研究の目的は、両生類における遺伝子ターゲティング技術の確立のための基礎研究である。具体的な研究計画は以下のように細分化される。

(1) *Xenopus tropicalis* の PGC（始原生殖細胞）の単離

(2) *Xenopus tropicalis* の PGC の培養方法の検討

(3) *Xenopus tropicalis* の PGC 由来の細胞への遺伝子導入法の検討

(4) Homologous recombination 法の検討

(5) *Xenopus tropicalis* の PGC 由来の細胞の生体への戻し移植技術の検討

これらを通じて、個々の遺伝子の機能解析に欠かせない遺伝子ターゲティングの基盤技術やその土台となる細胞生物学的研究を行う。

2. 研究の進捗状況

(1) *Xenopus tropicalis* の PGC（始原生殖細胞）の単離

PGC（始原生殖細胞）の単離に先立ち、*Xenopus laevis* で報告されている胚の PGC の追跡方法を採用し、胚の PGC のマーキングを行った。*Xenopus tropicalis* の生殖細胞質蛋白質である DEADSouth の遺伝子の 3' UTR を蛍光蛋白質 GFP 遺伝子のコーディング領域につないだ融合 mRNA を作製し、受精直後の植物極側にマイクロインジェクションし、後期胚まで発生させて蛍光標識された PGC を追跡した。蛍光標識を指標に胚から PGC を含む領域を手術によって単離した。

(2) *Xenopus tropicalis* の PGC の培養方法の検討

Xenopus laevis の培養細胞で一般的に用いられている L-15 培地をベースにした *Xenopus* 培養細胞用基本培地を作製し、単離した *Xenopus tropicalis* の PGC 含む領域を培養した。

(3) *Xenopus tropicalis* の PGC 由来の細胞への遺伝子導入法の検討

実験動物として研究に広く用いられており、*Xenopus tropicalis* よりも手術後の回復率が良く扱いやすい *Xenopus laevis* を用いて、*tropicalis* での実験に先立って条件検討を行った。*Xenopus laevis* を開腹しエレクトロポレーション法により、精巢の目的の細胞に遺伝子の導入が可能かどうか、また、導入した遺伝子が安定的に発現するかどうかを、蛍光蛋白質 GFP 遺伝子を用いて追跡、確認した。その結果、GFP 遺伝子が導入され、短期間ではあるが GFP タンパク質の蛍光が観察されたため、成体 *Xenopus* の精巢において遺伝子導入が可能であることがわかった。

(4) Homologous recombination 法の検討

導入する細胞の確率が終了していないため、Homologous recombination 方法の検討に向けて準備を行った。

(5) *Xenopus tropicalis* の PGC 由来の細胞の生体への戻し移植技術の検討

生体への移植を視野に入れ、現存する *Xenopus tropicalis* の系統においてどれだけ近交が進んでいるかを調べるために、系統間での交換移植を行った。現在もっとも同系交配が進んでいる Nigerian 系を含む 3 系統について調べたが、どの系統についても組織交換移植に耐えるほど、近交系ではないことがわかった。

3. 現在までの達成度

当初の計画どおり進展している。

(理由) 研究計画の5つの項目のうち、4つに関しては既に実験を進めているため。

4. 今後の研究の推進方策

Xenopus tropicalis の始原生殖細胞 (PGC) 由来の細胞の培養方法に加えて、近年急速に技術が発展している iPS 細胞 (Induced pluripotent stem cells; 人工多能性幹細胞) 作製の手法も取り入れて、多分化細胞樹立の検討を行う。iPS 細胞化を引き起こす因子としては、Sox2, Oct3/4, Klf4, c-Myc の4因子に相当する因子を使用し、ツメガエルにおけるこれらのホモログ遺伝子の検討を行う。4因子の導入方法としては、胚や体細胞を用い、一度に複数の因子が導入できるマイクロインジェクション法を中心にして検証を行う。iPS 様細胞が得られた後は、胚への移植を行いキメラ実験によって多分化能を調べる。実験動物としては研究に広く用いられており、*tropicalis* よりも扱いやすい *Xenopus laevis* を用いて、*Xenopus tropicalis* での実験に先立って条件検討を行う。

5. 代表的な研究成果

(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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計1件)

東京大学生命科学構造化センター 編、
東京大学出版会、写真でみる生命科学
Overview of Life Science、(2008)