

機関番号：82626

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） A study of gene targeting method in amphibians

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・幹細胞工学研究センター・研究員

研究者番号：90431824

研究成果の概要（和文）：両生類での遺伝子ターゲティング法の基盤技術として、多分化能のある細胞株の確立を目指した。始原生殖細胞（PGC）からの胚性生殖細胞（EG細胞）の樹立のために、蛍光標識を指標に幼生期の胚より PGC を含む生殖原器組織をマニピュレーションで単離し培養方法の検討をおこなった。また、初期胚と初代培養細胞を用いて、遺伝子導入による人工多能性幹細胞（iPS細胞）の作製と培養方法の検討も行った。

研究成果の概要（英文）：The main aim is establishment of a pluripotent stem cell line as a basic technology for gene targeting in amphibians. For establishment of embryonic germ (EG) cell line, the tissue piece including fluorescent-marked primordial germ cells (PGC) was isolated by manipulation from embryos and was preferred to examine culture condition. Using early embryos and primary cell culture, gene-transfer and culture methods were investigated to produce induced pluripotent stem cell (iPS cell).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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. 研究開始当初の背景

両生類は、脊椎動物が水生から陸生に変化した進化の上で非常に重要な位置を占め、生理学上、非常に有用なモデル動物である。また、卵生である利点と胚操作の簡便さを活かして、古くから脊椎動物の発生学に大きな貢献を果たしてきた。現在ではその中でも、ツメガエル（*Xenopus laevis* と *Xenopus tropicalis*）が分子発生学研究に多用されており、遺伝子導入やアンチセンスオリゴの導

入による遺伝子の機能解析が盛んに行われている。両種の EST プロジェクトは日本を含む複数のグループで進められており、遺伝子発現のプロファイルとして膨大な知見が蓄積されている。また、2倍体である *Xenopus tropicalis* を用いて純系の確立とミュータジェネシスプロジェクトが進められ、同時に、ゲノムプロジェクトも DOE Joint Genome Institute (JGI) で2002年より開始され、遺伝学的研究の基盤が整備されつつある。

このようにツメガエルは有用なモデル生物として、様々な優れた実験系が整備されているが、特異的阻害実験の確実な解析方法が確立されていない。現在用いられている一過性の遺伝子導入やアンチセンスオリゴの導入による遺伝子解析手法には様々な問題点が指摘されている。一つは、時空間的コントロールの難しさであり、マイクロインジェクションでは導入できる時期が発生の初期に限られている点や、導入する臓器・器官等の部位を厳密にコントロールできない点である。また、遺伝子の機能阻害はノックダウン形式であるため、100%の阻害ではない結果を得ることになり、しばしば結果の不明確さを招く。さらには、遺伝子の機能阻害のためのモルフォリノアンチセンスオリゴが設計できるかどうかは標的遺伝子の配列に依存していることや、効果を確かめるために用いられている表現系のレスキュー実験に関しては「時空間的コントロールの難しさ」により、遺伝子導入でレスキューできない可能性があるがこれを回避できない点等が挙げられる。これらの問題点は遺伝学の導入により解決でき、ミュータジェネシスプロジェクトの進展や、新しく遺伝子ターゲティング（遺伝子ノックアウト）技術を確認することが望まれている。

## 2. 研究の目的

遺伝子ターゲティング技術では、一般的に、多分化能のある細胞に、目的遺伝子の配列の一部と改変した配列を組み込んだベクターを導入し、そのうち、細胞のゲノム配列と Homologous recombination を起こしたものを薬剤耐性により選択培養し、胚内へ戻し移植を行ってキメラ動物を作製し、その子孫として、遺伝子ターゲティングされた個体を得るといった手順で行われる。両生類においては、多分化能のある細胞株が樹立されていないため、上述のすべての手順を新たに検討・確立しなければならない。そこで、本研究では、遺伝子ターゲティングの基盤技術として、多分化能のある細胞株の確立を目指す。

多能性細胞株の候補としては、ノックアウトマウスの作製では一般的に ES 細胞が用いられている。しかし、*Xenopus* では生殖細胞の分化が卵形成時に蓄えられる生殖細胞質に依存しており、胚体細胞から樹立される ES 細胞が生殖細胞系列に分化する可能性が低いことから、EG 細胞 (embryonic germ cell; 胚性生殖細胞) を用いた遺伝子ターゲティング法が有効と考えられる。胚の生殖細胞質のマーキングによる PGC (始原生殖細胞) の追跡が可能で、また、マス類において同方法で追跡・単離した PGC を他種の個体に戻し移植が可能であることが報告されているため、*Xenopus tropicalis* にも応用可能な手法

であると考えられる。

また、一方で多能性細胞株の候補としては iPS 細胞 (Induced pluripotent stem cell; 人工多能性幹細胞) があるため、こちらの可能性も検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) *Xenopus tropicalis* の始原生殖細胞 (PGC) の単離と培養方法の検討

実験動物として、2倍体であり性成熟までの期間が短い *Xenopus tropicalis* を用い、そのなかでも、以後の研究応用性を考え、ゲノムプロジェクトに供された系統である Nigerian 系統を用いる。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 の追跡方法を応用して、胚の PGC のマーキングを行い、蛍光標識を指標に発生時期の胚より PGC を含む細胞塊を単離する。

単離した PGC の培養にあたり、*Xenopus laevis* の培養細胞で一般的に用いられている L-15 培地をもとにした *Xenopus* 培養細胞用基本培地を作製する。哺乳類 EG 細胞培養等で増殖・多分化能維持の効果を確認されている増殖因子 SCF, LIF, bFGF 等に加え、*Xenopus tropicalis* PGC と PGC 由来の細胞の増殖に対する至適濃度を決定する。

### (2) *Xenopus tropicalis* の人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の作製と培養方法の検討

iPS 細胞化を引き起こす因子としては、哺乳類細胞で一般に用いられている 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方法としてマイクロインジェクション法やトランスフェクション法の検討を行う。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。

### (3) *Xenopus tropicalis* 生体への細胞の戻し移植技術の検討

哺乳類の多能性細胞株の性質の評価方法として、生体への移植によるテラトーマ形成能の判定が一般に用いられている。この手法を *Xenopus tropicalis* で利用するためには、組織の相互移植可能な系統を確立し、その系統から樹立した細胞株を同じ系統の個体に移植することが一つの適用方法となる。

Nigerian 系統は現在、掛け合わせにより純系化が進められているため、この系統での組織の相互移植可能性を皮膚移植によって確かめる。

#### 4. 研究成果

##### (1) *Xenopus tropicalis* の始原生殖細胞 (PGC) の単離と培養方法の検討

PGC (始原生殖細胞) マーキングのために、*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コンストラクトを作製した。このコンストラクトから、mRNA を合成し、受精直後の植物極側にマイクロインジェクションすることで PGC を蛍光標識し、後期胚発生時まで PGC が追跡できることを確認した (図 1) (未発表データ)。

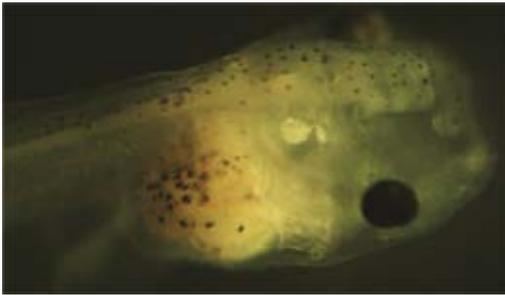


図 1 PGC が GFP タンパク質によって蛍光標識された *Xenopus tropicalis* 幼生 (上; 明視野、下; 蛍光)。矢印は PGC における GFP の蛍光を示す。

この方法を用いて、蛍光標識を指標に幼生期の胚より PGC を含む生殖原器組織をマニピュレーションで単離し、初代培養を行った。蛍光標識された細胞は培養最大 22 日間観察されたが、細胞数の増加は観察されなかった。このことから、増殖能の維持のためには、用いた培地では足りず、増殖因子等の添加が必要であると考えられる。

##### (2) *Xenopus tropicalis* の人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の作製と培養方法の検討

iPS 細胞化を引き起こす因子として、哺乳類の知見から Sox2, Oct3/4, Klf4, c-Myc の 4 因子を選択した。ツメガエル胚でこれらの 4 因子のオーソログのすべてが同定されているわけではないが、まず始めに文献情報よりホモログで機能も似ていると考えられる

Sox2, Sox3, Oct60, Klf4, c-Myc の 5 因子を検討した。ツメガエル胚にマイクロインジェクション法を用いて遺伝子導入を行った。実験動物としては研究に広く用いられており、*Xenopus tropicalis* よりも扱いやすい *Xenopus laevis* を用いて、*tropicalis* での実験に先立って条件検討を行った。5 因子を導入した胚は、胞胚期で細胞を播種した。

培養方法としては、胞胚期の胚をカルシウム/マグネシウムフリーの培養液で処理して、解離し、*Xenopus* 培養細胞用基本培地で培養したが、完全解離した細胞は付着・増殖しなかった。そのため、初代培養は組織培養として行い、その後、1 回目の継代の際に細胞を解離して播種を行うという方法に変更することで細胞の付着・増殖が改善した。

Sox2, Sox3, Oct60, Klf4, c-Myc の 5 因子を導入した胚の細胞は、培養開始後 10 日程度は増殖がみられた (図 2) (未発表データ)。

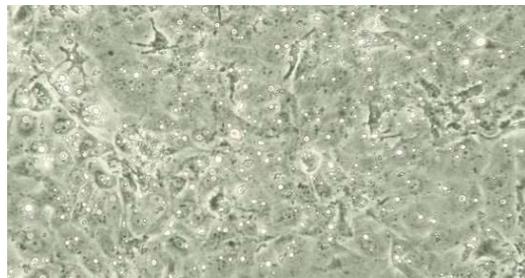
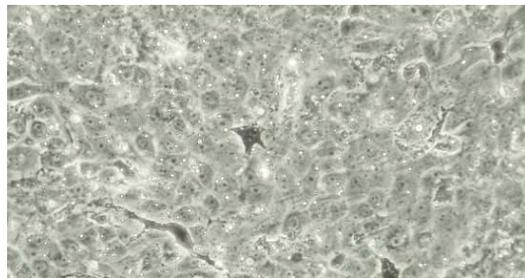


図 2 培養 10 日目の Sox2, Sox3, Oct60, Klf4, c-Myc を導入した胚の細胞 (上) と、導入していない胚の細胞 (下)

その後、培養開始後 2 週間程度から、細胞死がみられ、3 週間以内に生存する細胞がみられなくなり、継続して増殖する細胞株は得られなかった。

他の方法では初代培養ツメガエル細胞に、ウイルスベクターを用いて、リプログラミング機能が分かっているヒトの Sox2, Oct3/4, Klf4, c-Myc の 4 因子の遺伝子導入を行った。ウイルスの感染効率およびタンパク質発現効率のコントロールに GFP 遺伝子を用いて、カエル細胞でのウイルスベクターの効率を検討した。高い導入効率になる条件を用いて 4 因子の遺伝子導入を行い、培養・継代を行ったところ、4 ヶ月以上、生存・増殖が確認

された。細胞の形態はコントロール細胞と異なり、コロニー状の細胞塊を形成し、継代後も形態は維持された(図3)(未発表データ)。

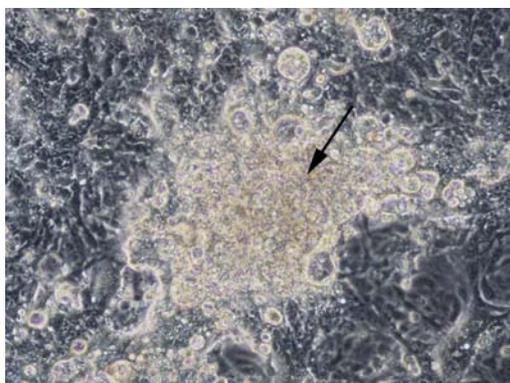
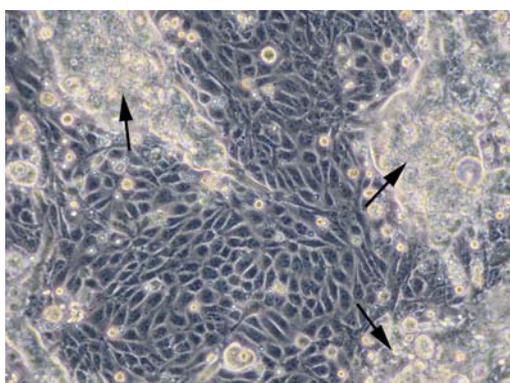
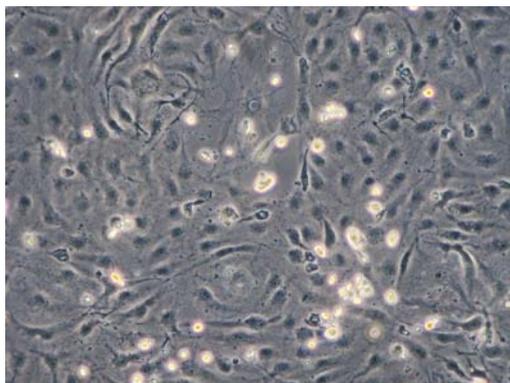


図3 EGFP 遺伝子を導入したツメガエル細胞の培養14日目の位相差顕微鏡像(上)。ヒトの Sox2, Oct3/4, Klf4, c-Myc の遺伝子導入したツメガエル細胞の培養14日目(中)と一継代後(下)の位相差顕微鏡像。矢印はコロニー状の細胞塊を示している。

### (3) *Xenopus tropicalis* 生体への戻し移植技術の検討

*Xenopus tropicalis* の中で、もっとも同系交配が進んでいる Nigerian 系で皮膚の交換移植を行った。その結果、移植された皮膚は、同個体(自家移植)では100%の個体で生着したが、兄弟同士で移植を行った個体で

は生着しない個体のみられた。このことは純系化が個体間の免疫拒絶を回避できるまでには至っていないことを示している。多能性細胞株の性質の評価方法としては、樹立した免疫が確立していない発生初期の幼生個体に戻し移植する方法が最適であると考えられる。

### 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)

〔図書〕(計1件)

①石浦 章一他、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、90-95

### 6. 研究組織

#### (1) 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・幹細胞工学研究センター・研究員

研究者番号：90431824

#### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：