

機関番号：24506
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20570209
 研究課題名(和文) トランスポゾンを利用した扁形動物プラナリアへの遺伝子導入法の開発
 研究課題名(英文) Trial for production of transgenic planarians using transposon systems.
 研究代表者
 織井秀文 (ORII HIDEFUMI)
 兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教
 研究者番号：70211836

研究成果の概要(和文)：扁形動物プラナリアは強い再生能力をもつ。この再生現象に、どのような遺伝子が、どのように関わるのかを明らかにするためには、この動物に外来遺伝子を導入する手法の開発が必要である。そこで、近年様々な生物で成功例が報告されているトランスポゾンを利用する方法をプラナリアに応用することを考えた。本研究では様々な導入を試みたが、残念ながらプラナリアへの遺伝子の導入することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：The planarians have high regeneration activity which is attractive for developmental biologists. In order to analyze the mechanisms of the planarian regeneration at a gene level, I tried to develop a method for production of transgenic planarians using various transposon systems. I have failed to introduce foreign genes into planarians in spite of many trials with various vectors and experimental conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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、再生、遺伝子、トランスポゾン

1. 研究開始当初の背景

扁形動物プラナリアは、その再生能力の強いことから、100年も前から、生物学者の興味を惹きつけてきた。そして、その再生時に見られる、体制をつくるルールを探る長年の研究は、動物一般の形態形成に関わる普遍的ルールの解明に役立ってきた。しかし、近年見られるマウス、ハエ、センチュウをはじめ

としたいわゆるモデル動物における発生遺伝学の技術的進展は、そのような技術の適用が困難なプラナリアのような実験動物を発生学研究の主役から追いやってしまった。ところが、1999年に報告されたプラナリアにおけるRNA干渉による特異的遺伝子機能の阻害の成功は、その後のプラナリア *Schmidtea mediterranea* の全ゲノム・ドラフトシーケン

スの決定、数種のプラナリアで進められた EST シーケンスプロジェクトと相まって、再びプラナリアに発生学研究のスポットライトが当たる契機となったのである。そのような状況で、プラナリアがモデル動物としてさらに必要な条件の一つが、プラナリアに外来遺伝子を導入し発現させることであった。本研究を始めるにあたり、学会等で様々な研究者と話してみると、プラナリアへの遺伝子導入については、多くの研究グループで試みられたようであったが、成功したという話はほとんど聞かなかった。唯一の例外が、バルセロナ大学サロ教授の研究グループであり、遺伝子導入の方法を確立したという報告とその方法を適用しプラナリアの再生におけるオートファジー関連遺伝子の機能を解析したという2つの報告をした。しかしながら、多くの研究者はその報告を疑問視しており、その真偽は定かでなかった。また、同じ扁形動物である住血吸虫において、その発現までは成功していないもののエレクトロポレーション法により外来遺伝子の導入に成功したという報告がなされたばかりであった。本研究が開始されたころは、様々な動物でトランスポゾンを利用した遺伝子導入法が報告されたころではあったが、扁形動物プラナリアにおいて、外来遺伝子を導入する技術は、まだ確立しているとは言い難い状況であった。

2. 研究の目的

本研究は、プラナリアにいかにして外来遺伝子を導入し、発現させるか、その方法を開発すること一点にある。そのための第一歩として、様々な動物種で成功しているトランスポゾンを利用した手法に着目し、プラナリアへの適用を試みることにした。この手法を確立することは、100年来、生物学者を魅了してきたプラナリアの再生の謎の解明に大

きく貢献することになる。期待される最終的な成果も、導入ができた、というものであり、本研究は「全か、無か」という単純明快な結果しかないものである。

3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエルをつかったトランスポゾン遺伝子導入系の検証

①トランスポゾン・レポータープラスミドおよびヘルパーmRNA 作製用鋳型 DNA の構築

piggyBac, minos, Hermes の各トランスポゾンベクターに CMV プロモーターの制御下においた蛍光タンパク質 GFP 遺伝子をレポーターとして導入した。また、トランスポゼースのコード領域を pCS2 にクローニングし直し、その mRNA を試験管内で合成した。

②アフリカツメガエル初期胚への導入

各トランスポゾン・レポータープラスミドを対応したトランスポゼース mRNA とともにアフリカツメガエル受精卵に微小注入した。頻度の差はあるが、いずれのトランスポゾンを使った場合においても、モザイク状に GFP の発現が認められるオタマジャクシが得られた。これらのオタマジャクシのゲノム DNA からトランスポゾンが挿入したという直接的証拠を得ていない。しかし、既報のツメガエルにおける遺伝子導入実験結果に照らして、このようなモザイク状の発現は、トランスポゾンが想定通りツメカエル染色体への組込まれたことを強く示唆している。また、トランスポゾン Hermes を利用した場合、多い時には注入した胚の2-3%にこのような発現が見られた。この頻度は、通常の遺伝子導入アフリカツメガエル作製効率に匹敵するものである。

(2) プラナリア遺伝子導入条件の検討

①プラナリア遺伝子プロモーターの単離とレポータープラスミドの構築

プラナリアの細胞で活性を持つプロモ-

ナリアの仲間には、難しさはあるものの実験室内で有性生殖が可能なものもあり、今後は、卵への遺伝子導入も試みる価値があろう。

用いたトランスポゾンのシステムが働くことを確認するために行った、アフリカツメガエル初期胚におけるトランスポゾン活性の検証実験において、従来の方法に匹敵する効率でアフリカツメガエルに遺伝子導入が起きたことを示唆する結果が得られたことは予期しない成果であった。トランスポゾンを利用した本方法は、膨潤させた精子核を扱う従来法に比べ操作が極めて簡単であることから、ツメガエルへの遺伝子導入の新たな手法になる可能性がある。

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1件)

1. Hidefumi Orie, Planarian regeneration in the absence of blastema. *Belgian Journal of Zoology*, 査読有 140 巻, 145-148. 2010

[学会発表] (計8件)

①織井秀文 他1名、プラナリア vasa 様タンパク質 DjVLG-A の発現、日本動物学会第81回大会、2010年9月23日、東京大学教養学部

②Hidefumi Orie, 'Timing of body patterning in regeneration of the planarian *Dugesia japonica*', XIth International Symposium on Flatworm Biology, 2009年7月26-30日, Hasselt University, Belgium

③D. Okano, M. Sato, T. Tsugawa, H. Orie, S. Ishida, 'Proliferating cells in the

intestines of polyclads.' XIth International Symposium on Flatworm Biology, 2009年7月26-30日, Hasselt University, Belgium

④織井秀文 他3名、プラナリア再生におけるパターン形成の決定時期、日本動物学会第79回大会、2008年9月23日、福岡大

[図書] (計1件)

小泉修 編、共立出版、動物の多様な生き方 5 さまざまな神経系をもつ動物たち 2009年、42頁-55頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

織井秀文 (ORII HIDEFUMI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教

研究者番号：70211836

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：