

機関番号：24303

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590190

研究課題名 (和文) トランスポゾンを用いた新たな遺伝子導入法の哺乳類組織細胞研究への展開

研究課題名 (英文) Application of transposon based transgene technique for mammals

研究代表者

八木田 和弘 (YAGITA KAZUHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：90324920

研究成果の概要 (和文)：本研究は、メダカ由来のトランスポゾン To12 を応用した新しい遺伝子導入ツールの開発および、その医学応用への展開を目的としている。本研究によって開発した遺伝子導入法を用い、ES 細胞やそこから分化した細胞を始めとした様々な細胞における哺乳類概日リズムの観察が可能になった。

研究成果の概要 (英文)：Circadian clock resides in most of cells in our body, and it is important to observe the circadian clock oscillation in various functional tissues. In this study, using Tol2 transposon based vector, we have succeeded to observe the development of circadian oscillator during the ES cell differentiation in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学系

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：トランスポゾン、概日リズム、ES 細胞

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、主に培養細胞を用いて概日時計の分子メカニズムを研究してきたが、これまでにかなり分子レベルでの理解が進んだ。しかし、生体内のほとんどすべての細胞に存在する概日時計が、それぞれの組織においてどのような生理機能と結びついているのかは、まだ未解明なところが非常に多い。本研究計画では、これまでの分子レベルでの

解析で蓄積してきた知見や材料を用いて、神経細胞や脳組織における概日分子時計がどのような生命現象に影響を及ぼしているのかを解析する。とくに、本基盤研究においては、様々な形態学および機能的解析をするための、メダカ由来のトランスポゾン To12 を応用した新たな効率的遺伝子安定導入法の確立など、技術的な基盤の構築を目指す。

2. 研究の目的

本研究課題では、To12 トランスポゾンを用いた新たな遺伝子導入ツールとして利用して、様々な生命現象の解明に役立てるための基盤研究を目的としている。

To12 トランスポゾンは名古屋大学の古賀と堀によって発見されたメダカ由来のトランスポゾンである (Koga et al, Nature, 1996)。その後、国立遺伝学研究所の川上らにより、トランスポゾンの転移に必要なシス配列が同定され、この配列に挟まれた任意のDNA を脊椎動物細胞のゲノムに挿入させることができるベクター系が構築された (Urasaki et al, Genetics, 2006)。現在ゼブラフィッシュを用いて効率的な遺伝子改変魚の作製や、タグラインの作製などで強力なツールとして使用され始めている。

筆者は、以前から遺伝研の川上博士の協力を受け、レトロウイルス以外では非常に困難であった初代培養細胞系への概日時計レポーター遺伝子の安定導入法の構築を試みている。

3. 研究の方法

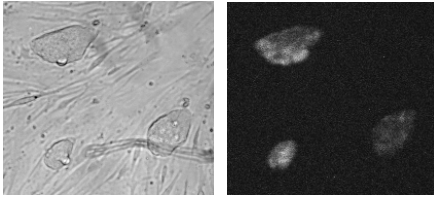
To12 トランスポゾンを新たな遺伝子導入ツールとして利用したベクターの構築とその応用として、細胞の概日時計をモニターできるレポーターベクターを To12 を用いて作製し、様々な初代培養細胞の概日時計振動をリアルタイム解析する。時計遺伝子 Bmal1 および Dbp 遺伝子のプロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ発光レポーターを、To12 トランスポゾンベクターにのせ、トランスポゾン転移酵素発現プラスミドとともに細胞に導入する。

4. 研究成果

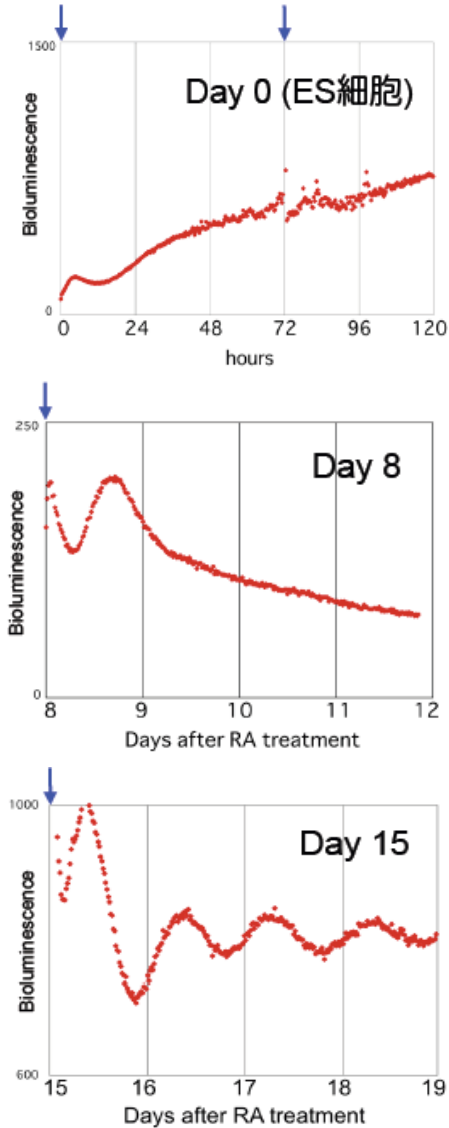
To12 トランスポゾンを新たな遺伝子導入ツールとして利用したベクターの構築とそ

の応用として、細胞の概日時計をモニターできるレポーターベクターを To12 を用いて作製し、様々な初代培養細胞の概日時計振動をリアルタイム解析することに成功した (Yagita et al, BMC Biotechnology, 2010)。時計遺伝子 Bmal1 および Dbp 遺伝子のプロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ発光レポーターを、To12 トランスポゾンベクターにのせ、トランスポゾン転移酵素発現プラスミドとともに細胞に導入すると、これまでウイルスベクター以外では極めて困難であった、初代培養細胞にも簡単に安定遺伝子導入ができるようになった。

さらに、この技術を応用して取り組んでいた研究として、概日時計の発生過程の解析がある。この課題についても To12 トランスポゾンを利用したレポーターベクターを応用して、1) ES 細胞には体細胞にあるような概日時計振動が見られないこと、2) 分化誘導培養することで概日時計が形成されること、3) 分化した細胞を再度未分化な iPS 細胞にすると再び概日時計振動がなくなることを明らかにし、PNAS 誌に発表した (Yagita et al, PNAS, 2010) (図 1、2)。この成果は、日経新聞、朝日新聞、毎日新聞、読売新聞、日刊工業新聞、日経産業新聞、その他地方紙など多数の新聞に取り上げられた。また、本研究について社会への還元の一環として、NHK 教育テレビ番組「サイエンス ZERO」に出演し、研究内容を紹介した。



(図1) Tol2 トランスポゾンベクターを利用した Bmal1:luc レポーターのES細胞への導入。
左：明視野、右：発光像



(図2) ES細胞の *in vitro* での分化誘導に伴う、概日時計の発生。Bmal1:luc レポーターによる発光リズムが分化に伴って形成されている。上段：ES細胞、中段：細胞分化8日目、下段：細胞分化15日目

さらに、To12 トランスポゾンベクターを用いた効率的なトランスジェニックマウス作製法の確立を目指し、国立遺伝学研究所川上浩一教授および隅山健太博士とともに研究を推進した。この研究の結果は、Genomics 誌に掲載された (Sumiyama et al, Genomics, 2010)。

当初、トランスポゾン To12 の哺乳類への応用は、細胞へのトランスフェクション効率やゲノムへのインテグレーション効率が全く未知であったため、どの程度有効な方法になるのか全く分からない状態であった。しかし、予想以上に哺乳類細胞への使用に適したベクター系であることが本研究を通して明らかになって来た。そのため、当初の予定よりも高水準で多くの成果を上げることができた。

今後は、本研究で構築したトランスポゾンベクターを様々な組織細胞に応用し、幅広い研究に利用する。また、既に海外を含む多数の研究者からベクターの分与の要望が多く寄せられており、日本はもとより、世界の研究者に本研究の成果を提供することにより、科学の発展に貢献していく。

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6件)

- ① Sumiyama K, Kawakami K, Yagita K, A Simple and highly efficient transgenesis method in mice with the Tol2 transposon system and cytoplasmic microinjection. *Genomics*, 95, 306-311, 2010, 査読あり.
- ② Yagita K*, Horie K, Koinuma S, Nakamura W, Yamanaka I, Urasaki A, Shigeyoshi Y, Kawakami K, Shimada S, Takeda J, Uchiyama Y, Development of circadian

oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cell in vitro.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107, 3846-3851, 2010, 査読あり.

- ③ Yagita K*, Yamanaka I, Emoto N, Kawakami K, Shimada S, Real-time monitoring of circadian clock oscillations in primary culture of mammalian cells using Tol2 transposon-mediated gene transfer strategy. *BMC Biotechnology*, 10, e3, 2010, 査読あり.
- ④ Yagita K*, Yamanaka I, Koinuma S, Shigeyoshi Y, Uchiyama Y, Miniscreening of kinase inhibitors affecting period-length of mammalian cellular circadian clock. *Acta Histochem. Cytochem.*, 42, 89-93, 2009, 査読あり.
- ⑤ Kiyohara, Y, Nishii K, Ukai-Tadenuma M, Ueda HR, Uchiyama Y, Yagita K*, Detection of a circadian enhancer in the mDbp promoter using prokaryotic transposon vector based strategy. *Nucl. Acids Res.*, 36, e23, 2008, 査読あり.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Yagita K., Development of Circadian Oscillator in Mammals., *SRBR 2010 Meeting of the Society for Research on Biological Rhythms*, May, 25, 2010, Destin, USA
- ② 八木田和弘. Chronogenesis during the ES cell differentiation in vitro., 第 3 2 回日本神経科学大会, 2009 年, 名古屋
- ③ 八木田和弘. Development of circadian oscillator during the mouse ES cell

differentiation in vitro., 第 8 2 回日本生化学会大, 2009 年, 神戸

- ④ 八木田和弘. ES 細胞と脳機能の発生, 北海道大学脳科学研究教育センター・シンポジウム, 2009 年, 札幌
- ⑤ Yagita K., Development of circadian oscillator during the mouse ES cell differentiation in vitro., *Gordon Research Conference: Chronobiology*, July, 23, 2009, Newport, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木田 和弘 (YAGITA KAZUHIRO)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：90324920

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：