

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657149

研究課題名(和文) 左右非対称性形成の分子機構解明を目指したトランスジェニック淡水産巻貝の開発

研究課題名(英文) Towards the creation of transgenic snails for the identification of the handedness determining gene

研究代表者

黒田 玲子 (Kuroda, Reiko)

東京理科大学・総合研究機構・教授

研究者番号：90186552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：トランスジェニック巻貝の作製技術を開発するために、巻貝初期胚への遺伝子導入および外来遺伝子を生殖細胞で発現させることが可能な発現ベクターの作製を検討した。巻貝の内在性 β -アクチンプロモーターを利用した発現ベクターを用いることで、外来遺伝子導入胚の発生率を向上させることができた。また、I-SceI meganuclease法と組み合わせた遺伝子導入法の検討を行い、トランスジェニック巻貝作製に向けた足がかりを得ることにつながった。

研究成果の概要(英文)：In order to develop methods to produce transgenic snails, the techniques of gene transfer into early embryos and of generating expression vectors which can express a foreign gene in germ cells were investigated. With the use of an expression vector containing the endogenous β -actin promoter sequence, we have succeeded in increasing the survival rate of embryos containing injected exogenous DNA. I-SceI meganuclease method was also applied to obtain the transgenic snails.

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：発生遺伝

1. 研究開始当初の背景

淡水産巻貝の *Lymnaea stagnalis* は天然に同一種で右巻きと左巻きの両方が存在する非常にめずらしい巻貝であり、この左右の巻型の違いは一遺伝子座にコードされている巻型決定遺伝子によって決定されている。巻型決定遺伝子は母性因子として初期卵割過程で機能し、細胞骨格系を制御することで螺旋卵割の割球配置パターンを制御する働きをしており、それが左右非対称な遺伝子発現パターンの制御、左右巻型形成につながることを先行研究で明らかにしてきた。しかしながら、巻型決定遺伝子の正体は未だ解明されておらず、発生学における大きな謎のままである。今後、この巻型決定遺伝子の同定を目指す上で、母性発現遺伝子の機能を評価することができる germline トランスジェニック巻貝の開発が必須であるが、この巻貝種も含め、軟体動物全般で germline トランスジェニックを作製した報告例はない。海産貝類のアワビ、カキ等では生殖細胞を媒介とした遺伝子導入や、生殖巣をターゲットとした遺伝子導入が試みられており、導入した外来 DNA のゲノムへのインテグレート、発現プロモーターの活性までは確認されているが、次世代に遺伝した報告は為されていない。この淡水産巻貝においてトランスジェニック技術を開発することは、発生生物学のみならず、神経生理学、疫学、生物工学的な研究への発展も期待できる。

2. 研究の目的

巻型決定遺伝子の同定に必須なトランスジェニック巻貝を作成するために、種々の手法を検討し、より可能性のある手法を確立することを目的としている。

(1) 巻貝初期胚への外来遺伝子導入法の検討を行った。*L. stagnalis* の受精は体内で行われており、体外で人工授精させる技術は確立されていないため、生殖細胞を媒介とした遺伝子導入法は適さない。また、生殖巣は厚い肝臓組織に覆われており、直接アプローチすることが困難である。そのため、発現ベクターを産卵直後の受精卵にマイクロインジェクションで導入する方法を検討した。産卵直後はまだ第一減数分裂の途中であり、雌雄前核の融合は産卵後数時間を経た第二極体放出後である。この間、母性ゲノムは核膜に包まれることなく露出しているため、導入した外来 DNA が減数分裂期の組換えと修復機構によってゲノムにインテグレートされることを期待した。

(2) 外来遺伝子を母性因子として生殖細胞で発現させることが可能な germline トランスジェニックの作製を目指す上で、適切な発現プロモーターの選択は重要である。そこで、1細胞期胚で発現している母性由来遺伝子のプロモーターを利用することを検討し、他生

物種でも報告例の多い β -アクトチンのプロモーターの利用について検討を行った。

(3) 巻貝初期胚への過剰な外来遺伝子の導入は正常な初期発生を妨げてしまうため、可能な限り導入量を減らし、ゲノム DNA へのインテグレート効率を上げる方法を検討した。モデル生物でその有効性が報告されている I-SceI meganuclease 法の応用を試みた。

3. 研究の方法

(1) モデル生物で実績のあるウイルス性 CMV プロモーターを利用して蛍光タンパク質 mCherry を発現させる外来遺伝子発現ベクターを作製した。これを制限酵素処理で直鎖化して 10-100 ng/ μ l の濃度で 1細胞期胚にマイクロインジェクションにより導入した。正常に卵割が進んだ胚は当研究室で開発したキャピラリー培養法により稚貝まで成長させることを試みた。

(2) 1細胞期胚で発現している母性由来の β -アクトチン遺伝子をクローニングし、その配列情報を元にインバース PCR 法でさらに上流のゲノム配列を得た。*L. stagnalis* 内在性 β -アクトチンプロモーターで mCherry を発現させる外来遺伝子発現ベクターを作製し、これを用いて上記と同様の遺伝子導入実験を行った。

(3) (2) で作製した発現ベクターのプロモーター上流及び SV40 ポリアデニル化シグナルの下流に I-SceI meganuclease の認識配列を付加した外来遺伝子発現ベクターを作製した。これを I-SceI と共に用いて上記と同様の遺伝子導入実験を行った。

4. 研究成果

(1) 濃度 100 ng/ μ l で導入した胚では、胞胚期まで進んだものの中 33~59% でレポーターの mCherry 蛍光が初期卵割の段階から観察された。この巻貝種では 1細胞期胚への発現ベクターの導入で、初期卵割時から外来遺伝子の発現が可能であることが確認された。しかし、正常発生率は低く、稚貝までの生育は困難であった。より強い蛍光の観察された胚では、卵割途中での割球脱離や、多核化が生じてしまうなどの発生異常が観察された。一方で、濃度を下げて導入した胚 (10-50 ng/ μ l) では正常に卵割が進行し、稚貝まで成長させることができたが (25~72%) mCherry 蛍光の観察された稚貝は得られなかった。この結果から、外来 DNA 分子を過剰に 1細胞期胚に導入してしまうと正常な卵割を妨げてしまうが、適度な濃度に抑えれば正常に発生させることが可能であることが分かった。また、発現プロモーターの過剰な転写活性が正常な発生を妨げている可能性も考えられた。蛍

光タンパク質自体は初期発生に影響を与えないことを先行研究で報告している。そのため、巻貝初期胚への遺伝子導入は、初期発生に影響を与えない適切な内在性プロモーター発現ベクターの検討と、導入量を抑えながらゲノムへの取り込み効率を上げる工夫の検討に絞って進めることにした。

(2) *L. stagnalis* の 1 細胞期胚で母性発現している β -アクチンのクローニングを行い、2 つのアイソタイプの cDNA 配列を得た。一方のアイソタイプの 5' 非翻訳領域の配列を利用して巻貝ゲノム DNA を鋳型にしたインバース PCR を行い、転写開始点より上流 4.3kb のゲノム DNA 配列をクローニングすることができた。他生物種での報告例からも β -アクチンのプロモーター領域及び転写調節領域が十分にカバーされていると推定される。得られた配列情報を用いて、プロモーター領域及び 5' 非翻訳領域を組み込んだ *L. stagnalis* 内在性 β -アクチンプロモーター発現ベクターを構築した。これにレポーターの mCherry を組み込んだ外来遺伝子発現ベクターを複製し、1 細胞期胚へ 100 ng/ μ l の濃度で導入した。その結果、胞胚期には mCherry の蛍光が観察され、クローニングした β -アクチンプロモーターが初期発生でも機能することが確認された。(1)で得られた結果よりも胞胚期までの発生率は大きく改善しており、稚貝レベルまで成長した胚も得られてきたが、今のところ導入遺伝子がゲノムにインテグレートした結果は得られていない。現在、導入濃度の検討を行い、稚貝までの成長個体数を増やすことで、ゲノムへのインテグレートが確認されることを期待して進めている。

(3) I-SceI 0.5-1 U/ μ l と発現ベクター 100 ng/ μ l の濃度で 1 細胞期胚に導入したところ、初期発生に大きな影響は見られず、導入胚は胞胚期まで進み、mCherry の蛍光も観察された。これをキャピラリー培養法により稚貝まで成長させることを試みたが、原腸胚で異常になってしまった。おそらく共インジェクションした I-SceI の効果による導入遺伝子のふるまいが影響しているものと予想される。目的とする導入遺伝子の濃度を下げる方向で進められるものと考え、現在も検討を進めている。

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)

Masanori Abe, Hiromi Takahashi and Reiko Kuroda. Spiral cleavages determine the left-right body plan by regulating Nodal pathway in monomorphic gastropods, *Physa acuta*.

The International Journal of Developmental Biology, 査読有り, Spiralian special issue, 2014, in press

Reiko Kuroda. How a single gene twist a snail. *Integrative and Comparative Biology*, in press.

[学会発表](計 7 件)

黒田玲子. 生命の諸階層を貫く左右対称性. 第 3 回 総合研究大学院大学「異分野統合フォーラム」(招待講演), 2014 年 2 月 6 日, 総合研究大学院大学葉山キャンパス (神奈川)

Reiko Kuroda. How a single gene twist a snail. The annual meeting of the Society for Integrative and Comparative Biology (Invited talk), Jan 4 2014, Austin, Texas, USA

阿部真典・黒田玲子. 巻貝の左右巻型形成には発生過程を通して継続的な *nodal-Pitx* の左右非対称な発現が関与する. 第 36 回 日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 4 日, 神戸ポートアイランド (神戸)

黒田玲子. カイロモルフォロジー研究: キラリティーの識別、創成、増幅、測定への挑戦から、巻貝の巻方向決定の謎の解明まで. 北海道大学 CCB セミナー (招待講演), 2013 年 9 月 11 日, 北海道大学 (北海道)

Reiko Kuroda. Molecules, crystals and living organisms looking through the eyes of chirality (Invited talk), June 17 2013, Gotenburg, Sweden

阿部真典・清水美穂・黒田玲子. 淡水産巻貝 *Lymnaea stagnalis* の発生過程における *nodal* の左右非対称な発現パターンの解析. 第 35 回 日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 14 日, マリンメッセ福岡 (福岡)

荒川泰範・阿部真典・清水美穂・黒田玲子. 淡水産巻貝 *Lymnaea stagnalis* 胚における *brachyury* 発現パターンの解析. 第 35 回 日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 14 日, マリンメッセ福岡 (福岡)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 玲子 (REIKO KURODA)
東京理科大学・総合研究機構・教授
研究者番号：90186552

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

阿部 真典 (MASANORI ABE)
東京理科大学・総合研究機構・助教
研究者番号：60599918