

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650084

研究課題名(和文)精子幹細胞を標的にしたトランスジェニック爬虫類の作製

研究課題名(英文)Establishment of transgenic reptiles by targeting spermatogonial stem cells

研究代表者

野村 真(Nomura, Tadashi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10323007

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究課題では、成体オスの精巣に存在する精子幹・前駆細胞に外来遺伝子を導入することでトランスジェニック爬虫類の作製を試みた。直鎖状にしたRFP発現ベクターおよびトランスポゾン配列を持つGFP発現ベクターをソメワケササクレヤモリ精巣に注入し、電気穿孔法による遺伝子導入を行った。遺伝子導入10日目に精巣を単離したところ、精細管内にRFPおよびGFP発現細胞が確認された。またF1個体の組織を単離しジェノタイピングを行ったところ、1個体においてRFP遺伝子の増幅が確認された。今後、遺伝子導入効率をさらに上昇させることで、簡便なトランスジェニック爬虫類の作製が可能であると推測される。

研究成果の概要(英文):The aim of this project is the establishment of transgenic reptiles as a new experimental model of life sciences. To achieve this purpose, we targeted adult testicular stem cells and introduced expression vectors for fluorescent proteins (a linearized RFP expression vector and GFP expression vector with transposon sequences) into the testis of adult Madagascar ground geckoes. At 10 days after in vivo electroporation, we confirmed RFP and GFP expression in the testicular cells in seminiferous tubes. Furthermore, we detected RFP transgene in 1 of 8 embryos by genomic PCR analysis. These data suggest that making transgenic reptiles by targeting adult testicular stem cells is highly feasible, although further technical improvements are required to increase the efficiency of transgenesis.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：トランスジェニック動物 爬虫類 精巣 電気穿孔法 発現ベクター トランスポゾン

### 1. 研究開始当初の背景

ユニークなモデル動物の樹立は医学・生物学研究を大きく進歩させてきた。哺乳類であるマウス、また硬骨魚類であるゼブラフィッシュは、それぞれ飼育や繁殖の容易性、さらには古典遺伝学と分子遺伝学的手法の導入により医学・生物学のモデル動物として現在世界中で使用されている。遺伝学的手法の導入が困難な動物種においても、トランスジェニック技術の確立はモデル動物としての有用性を大きく進歩させてきた。例えば発生生物学の研究材料として広く用いられているアフリカツメガエルやニワトリ、ウズラにおける外来遺伝子の生殖系列細胞への導入法が確立されており、再生医学や製薬研究における応用価値が飛躍的に高まっている。様々な脊椎動物は特異的な形態や行動様式を進化させており、こうした生物学的特徴の多様性の理解のためにも、新規モデル動物の樹立は生物学的に大きな意味を持つ。爬虫類は脊椎動物の中では魚類に次ぐ多様性を持った動物群である。一般的には鳥類、哺乳類以外の羊膜類（羊膜の中で胚発生が進行する動物群）を含む分類群であり、ヘビ、トカゲ目、カメ目、ワニ目などがこの集団に含まれる。現存する爬虫類は 8000 種以上存在し、変温性や尿酸排出、四肢の消失など解剖学的・発生学的・生理学的にユニークな特徴を備えた種が多い。さらに神経系や付属器の再生能力を持つ種もあり、再生医学の研究材料としても有用である。しかしながら多くの爬虫類は特異な生殖行動や季節性の産卵様式、さらには胚操作が困難であったため、医学・生物学研究におけるモデル動物としてはほとんど注目されてこなかった。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、爬虫類を新たなモデル動物として確立するため、生殖系列に外来遺伝子が挿入されたトランスジェニック爬虫類作製技術の完成を目指した。爬虫類の中でも例外的に飼育・繁殖が容易で多量の卵が採取可能なマダガスカル産の地上性ヤモリ（ソメワケササクレヤモリ *Paroedura pictus*）を材料として、成体オスの精子幹細胞への遺伝子導入によって外来遺伝子が安定的にゲノムに組み込まれた個体を作製することを目指した。

### 3. 研究の方法

本計画では制限酵素によって直鎖状にした pCAGGS-mRFP ベクター (0.2ug/uL) と、To12

Transposon 配列を持つ GFP 発現ベクター (pT2AL-EGFP: 1.0ug/uL) を To2 transposase 発現ベクター (pT2TP: 1.0ug/uL) と混合して成体オスヤモリ精巣に注入後、電気穿孔法により精子幹・前駆細胞に遺伝子を導入した。遺伝子導入個体は手術後メスヤモリと交配させ、産卵された卵を採取、胚組織からゲノムを抽出してジェノミック PCR および組織免疫化学的手法により外来遺伝子の発現とホストゲノムへの組み込みを検証した。

### 4. 研究成果

#### ・ 麻酔下でのヤモリ精巣への遺伝子導入法の確立

本計画では成体オスヤモリの麻酔下での開腹と電気穿孔法による遺伝子導入、さらに手術後にメス個体への交配を行う必要があった。そこで非哺乳類成体の低侵襲性麻酔としてイソフルランを使用し、吸入麻酔装置を用いて麻酔を行った。実験の結果、安定的な麻酔のために、哺乳類よりも高濃度での麻酔が必要であることが判明した(4%、400mL を持続)。また、爬虫類の精巣は哺乳類と異なり腹部背側側に位置するため、開腹して精巣を保定しつつプラスミド DNA を精巣内に注入した。DNA 溶液の注入には電動マイクロインジェクター (BEX BJ100) を用いた。ガラスニードルを精巣に穿孔することで、精細管内にも DNA 溶液が充填されることを確認した。DNA 溶液を注入後、ディスク型電極 CUY650-P3 を用いて、28V、50ms pulse on、950ms pulse off、inverted pulses 計 6 回を片側の精巣に導入した。両側の精巣に電気穿孔法で遺伝子を導入後、抗生物質を添加した HBSS で腹腔内を満たし、開腹部分を縫合した。手術を行ったヤモリはすべて生存した。麻酔から開腹したヤモリは一定期間ののちメスと交配させた。

・ 精細管内細胞での蛍光タンパク質の発現  
遺伝子を精巣に導入したオスのヤモリ (合計 3 匹) のうち 2 匹について、電気穿孔後 10 日目に精巣を摘出し、免疫組織科学的手法により蛍光タンパク質の発現を検討した。その結果、精細管内の多数の細胞に RFP および GFP の発現が確認されたことから、電気穿孔法により外来遺伝子がヤモリ精細管内の細胞に導入されていることが推測された。しかしながらこの段階で成熟した精子における蛍光タンパク質の発現は確認できなかった。

・ 外来遺伝子の F1 個体への伝播

精巢への遺伝子導入を行ったオスを野生型メス(140202-1、-2、-3)と交配し、産卵された胚組織を回収してジェノミック PCR および免疫組織化学的手法により蛍光タンパク質の発現を検討した。一般的に使用されている EGFP および RFP 増幅用プライマーはヤモリゲノム中の配列を認識してしまうことが判明したため、EGFP、RFP の ORF およびベクター配列に対するプライマーを再設計し、様々な PCR 条件を検討した。その結果、組織を採取した 8 個体中 1 個体で RFP 遺伝子の特異的な増幅が認められた。この個体について凍結切片を作製し RFP に対する抗体を用いて発現を検討したが、RFP の発現は観察できなかった。従って、この個体に関しては外来遺伝子のゲノム挿入が起こり F1 個体に伝播したが、ゲノム状の位置効果あるいはエピジェネティックな影響により蛍光タンパク質の発現が抑制された可能性が考えられた。現在引き続き遺伝子導入オス個体とメスの交配を行っているが、今後、外来遺伝子導入効率とゲノム挿入効率を上げるため、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入を検討している。また、BrdU および EdU を用いて精子幹細胞から成熟精子への分化時間の計測、精子の体外培養と遺伝子導入を検討している。

#### 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 6 件)

1. W. Yamashita, T. Nomura. The neocortex and dorsal ventricular ridge: functional convergence and underlying developmental mechanisms. *Brain Evolution by Design* (S. Shigeno, Y. Murakami and T. Nomura ed), Springer Japan, 2016 in press. 査読有
2. T. Nomura, C. Ohtaka-Maruyama, W. Yamashita, Y. Wakamatsu, Y. Murakami, F. Calegari, K. Suzuki, H. Gotoh, K. Ono. The evolution of basal progenitors in the developing non-mammalian brain. *Development* 143, 66-74, 2016. doi: 10.1242/dev.127100 査読有
3. T. Nomura, W. Yamashita, H. Gotoh, K. Ono. Genetic manipulation of reptilian embryos: toward an understanding of cortical development and evolution. *Frontiers in Neuroscience* 9, 1-11, 2015. doi:

10.3389/fnins.2015.00045. 査読有

4. T. Nomura, Y. Murakami, H. Gotoh, K. Ono. Reconstruction of ancestral brains: exploring the evolutionary process of encephalization in amniotes. *Neuroscience Research* 86, 25-36, 2014. doi: 10.1016/j.neuro.2014.03.004. 査読有
5. 野村真「哺乳類大脳皮質の拡大をもたらした分子機構の解明: 進化発生学、幹細胞生物学を基盤とした研究戦略の試み」*京都府立医科大学雑誌* 123, 607-616, 2014. 査読無
6. 後藤仁志、野村真、小野勝彦「細胞内エネルギー代謝と生理機能」*Studia Humana et Naturalia* 48, 63-70, 2014. 査読無

[学会発表](計 8 件)

1. T. Nomura, C. Ohtaka-Maruyama, W. Yamashita, Y. Wakamatsu, Y. Murakami, F. Calegari, K. Suzuki, H. Gotoh, K. Ono. Convergent evolution of pallial basal progenitors in amniotes. *Cortical Evolution Conference 2015*, 2015 年 5 月 18 日~5 月 20 日、Spain.
2. T. Nomura. Evolution of progenitor dynamics and transcriptional regulation in amniote brains. 第 48 回日本発生生物学会大会(招待講演) 2015 年 6 月 5 日、茨城県つくば市
3. T. Nomura. Evolution of cortical structures in mammalian and non-mammalian lineages. 第 38 回日本神経科学学会(招待講演)2015 年 7 月 28 日、兵庫県神戸市
4. 野村真「胚操作技術を用いた羊膜類大脳皮質進化過程の解明」細胞を創る会 8.0 (招待講演) 2015 年 11 月 13 日 大阪府吹田市
5. T. Nomura. Changes in progenitor dynamics during amniote evolution. The 7<sup>th</sup> Research Conference of Developmental Neurobiologists in Korea (招待講演)、2015 年 12 月 18 日 韓国
6. T. Nomura. Regulation of neural stem cells and brain evolution in amniotes. *Neural stem cell in Evolution* (招待講演) 2014 年 7 月 8 日 Dresden Germany

7. T. Nomura, F. Calegari, Y. Murakami,  
H. Gotoh, K. Ono. Regulation of neural  
stem cells and brain evolution in  
amniotes. 47<sup>th</sup> annual meeting of JSDB  
and APDBN, 2014年5月28日 愛知県名  
古屋市

後藤 仁志 (GOTOH, Hitoshi)  
京都府立医科大学・教養部生物学教室・大学  
院神経発生生物学・助教  
研究者番号：20462202

8. T. Nomura, H. Gotoh, K. Ono  
Evolution of transcriptional  
regulations underlying  
species-specific neuronal  
diversities in amniotes. CDB  
Symposium, "Time in Development".  
2014年3月5日～6月23日、兵庫県神  
戸市

村上 安則 (MURAKAMI, Yasunori)  
愛媛大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号：50342861

〔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(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  
<http://tadnom.jimdo.com>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

野村 真 (NOMURA, Tadashi)  
京都府立医科大学・教養部生物学教室・大学  
院神経発生生物学・准教授  
研究者番号：10323007

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

小野 勝彦 (ONO, Katsuhiko)  
京都府立医科大学・教養部生物学教室・大学  
院神経発生生物学・教授  
研究者番号：30152535