

発生脊髄運動ニューロンをラベルする

佐藤 昇

新潟大学大学院医歯学総合研究科
肉眼解剖学分野

Labeling of Spinal Motoneurons During Development

Noboru SATO

*Division of Gross Anatomy and Morphogenesis
Department of Regenerative and Transplant Medicine
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*

Abstract

Recent methodological advances using viral and non-viral vectors have allowed for efficient gene delivery into the chicken embryo which is a classical model for studying vertebrate development. Rous sarcoma virus (RSV) - derived replication-competent avian retroviral vectors and in ovo electroporation method can offer efficient transgene expression temporally as well as spatially. Recent progress suggest that gene transfer techniques in combination with the tet regulatory system can allow transgene expression at defined time of development in the chicken embryo. Using these techniques, the action of specific apoptosis-related molecules could be investigated in the developing spinal motoneurons at the time of programmed cell death. Thus, these strategies can provide a valuable tool to address specific biological questions in vertebrate morphogenesis.

Key words: chicken embryo, doxycycline, inducible gene expression, in ovo electroporation, replication-competent retroviral vector, tet regulatory system

はじめに

われわれの体がどのようにつくられるのか？こ

の答えを得る鍵は胚の発生・発達過程にある。その解析のために古くから脊椎動物のモデルとして重用されているものの一つが鶏胚（ニワトリ胚）

Reprint requests to: Noboru SATO
Division of Gross Anatomy and Morphogenesis
Department of Regenerative and
Transplant Medicine Niigata University Graduate
School of Medical and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学大学院医歯学総合研究科肉眼解剖学分野
佐藤 昇

である。鶏胚は安価で簡便（発育の設備や管理）な実験動物である。さらに、①卵の殻に孔を開けて胚の発育の全経過が観察可能である点、②さまざまな微小手術（移植やキメラ胚作成など）が可能である点、③薬物・生理活性物質を投与しその効果を生体で容易に検討できる点、などの胚操作に優れた面を多く有する。その一方で、トランスジェニック動物の作成などの遺伝子操作の点でマウスやゼブラフィッシュに比較して後れを取っていた。最近になって鶏胚を用いた遺伝子導入技術でいくつかのブレイクスルーがあり、遺伝子操作についてもむしろ優れたモデル動物となりつつある。本稿では鶏胚での遺伝子導入を紹介しながら、遺伝子導入によって発生過程で脊髄運動ニューロンを標識する方法について解説する。

増殖型レトロウイルスベクターによる 遺伝子導入

当初、鶏胚での遺伝子導入はウイルスベクターを用いる方法が最も試みられていた。その一つはアデノウイルスベクターであり、げっ歯類では様々な系で有効性が確認されている。我々も初代培養の脊髄運動ニューロンへアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行っていたが、胚では遺伝子導入の効率と毒性のコントロールが難しく使用をあきらめた経験がある。実際、ニワトリではマウス等に比してヒトアデノウイルスは感染効率が悪く、より高力価のウイルス（毒性も高まる）を必要とする。当時最もポピュラーなウイルスベクターは Hughes 博士らが開発した Rous 肉腫ウイルス由来の RCASBP (Replication-Competent, ALV LTR, Splice acceptor, Bryan Polymerase) である¹⁾。このレトロウイルスベクターは増殖型であるため、①最初に感染した細胞のみならず、二次的にも増殖したウイルス粒子が周囲の細胞へ感染していくことから極めて遺伝子導入効率が良い、②特別なパッケージング細胞を必要とせず、高力価のウイルスの精製が容易である、など利点がある。一方、増殖型レトロウイルスはウイルス複製のための遺伝子コンポーネントをすべて保持

しているため、実際の外来遺伝子の組み込みは複製と関係のない src 遺伝子と置き換えることによる。このため挿入できる遺伝子のサイズは 2~3kb 程度と制約がある。外来遺伝子の発現は宿主細胞での RSV-LTR の転写活性と alternative splicing によって起こる。我々はこのウイルスを用いてニワトリ胚頸髄の運動ニューロンへの遺伝子導入とその機能を解析することに成功した²⁾。しかしながら遺伝子発現は前述のように RSV-LTR 活性と alternative splicing によるため、求めるタイミングで求める細胞（組織）へ外来遺伝子を導入することは難しい。

増殖型レトロウイルスでの 遺伝子発現の制御への試み

RCASBP ベクターの改変型で splice acceptor を除去した RCANBP ベクターは内部プロモーターを用いることができる¹⁾。このベクターがうまく機能すれば適当な内部プロモーターによって導入遺伝子発現のコントロールが可能となることが期待される。ただし同じような増殖型レトロウイルスであるため、挿入できる外来遺伝子のサイズはやはり 2~3kb 程度と制限がある。そのため比較的短い制御領域である CMV プロモーターを内部プロモーターとして用いた場合についてまず検討した。ニワトリ由来不死化線維芽細胞に RCANBP/CMV ベクターを感染させた場合、一部の細胞で強い導入遺伝子発現が認められる一方で発現が弱い細胞も多く見られ、発現レベルが細胞によってバラつきがあることがわかった。RCASBP ベクターを感染させた場合はどの細胞も同程度の遺伝子発現が認められることから、RCANBP ベクターでは内部プロモーターとしての CMV プロモーターが機能して細胞の状況に応じてその活性が現れていると推測された。鶏胚に RCANBP/CMV ベクターを感染させた場合、外来遺伝子が網膜色素上皮、若い脊髄神経節細胞、肝臓などに限局して良く発現した。RCASBP ベクターでは網膜色素上皮や肝臓では遺伝子発現は見られない一方で、脊髄神経節では全体に発現が認められた。

これらの結果から、RCANBP ベクターを用いることで導入遺伝子の発現をコントロールし得ることが明らかとなった³⁾。

遺伝子発現のタイミングを コントロールできるか？

形態形成が進む発生期は時間軸に従ってダイナミックに様々な現象が起きる。また分子レベルでも同一の分子が場所や時期によって異なる働きをすることも多い。したがって特定の現象を理解するためには、同一の分子であっても特定の時期にどのような働きをしているのか突き止める必要がある。ある分子を任意のタイミングで発現させることができれば、形態形成を理解する上でかなり有望な手法となることが期待される。我々は、短い転写調節領域が RCANBP ベクターで機能したことから、この系でテトラサイクリン調節系を応用する試みに着手した。テトラサイクリン調節系は、テトラサイクリン及びその誘導體（ドキシサイクリンなど）存在下で tet 調節蛋白がテトラサイクリン反応領域（tet operator）に結合することで、転写調節（遺伝子発現のスイッチが on あるいは off になる）がなされる系である。我々は調節蛋白として rtTA（reverse tetracycline-controlled transactivator）を CMV プロモーター下で発現させ、ドキシサイクリン添加で遺伝子発現スイッチが on になるような RCANBP ベクターを準備した。初期の胚に感染させたところ、そのままでは予想通り遺伝子の発現は認められなかった。感染後一定期間の後ドキシサイクリンを添加した胚では、24 時間後には網膜色素上皮や肝臓といった CMV プロモーターがよく機能していた組織で遺伝子発現が確認された。肝臓ではドキシサイクリンを添加しない対照群に対して、ドキシサイクリン添加群では約 10 倍の遺伝子発現が認められた。すなわちニワトリ胚で導入遺伝子の発現を任意のタイミングで誘導することに成功したのである³⁾。

生体エレクトロポレーションによる 遺伝子導入

鶏胚で tet-on による導入遺伝子発現の時間的コントロールが可能となった一方で、空間的な遺伝子発現のコントロールは増殖型レトロウイルスベクターでは難しいところがあった。我々は当時、脊髄前角の運動ニューロンへ特異的に遺伝子導入を行う方法を模索していたが、よく知られた運動ニューロン特異的なエンハンサー・プロモーターが RCANBP ベクターに組み込むには大きすぎた。そこで運動ニューロン特異的なプロモーター領域を用いるために、当時ニワトリ胚で新たな遺伝子導入法として広がり始めた生体エレクトロポレーション法⁴⁾を試みることにした。もともとエレクトロポレーション法はバクテリアや細胞などへ遺伝子導入する際に用いられる手法であるが、電気パルス発生装置などの改良によって生体でも実行可能となった手法である。原理は単純で、電極には含まれた空間に DNA（発現ベクターなど）があれば、電気パルスをかけた際にマイナス荷電している DNA がプラス極へ移動することを利用して、例えば脊髄の場合、中心管内に発現ベクターを注入し神経管を二本の電極で挟んで電気パルスを発生させると、プラス極の脊髄半側で遺伝子導入が起こる。発現ベクターは通常の DNA であれば特に制約はないので、幾つかの運動ニューロン特異的なプロモーターを組み込んだベクターで試したところ、脊髄前角の運動ニューロン特異的に遺伝子が導入された。これにより生体エレクトロポレーション法によって、ニワトリ胚で空間的な導入遺伝子発現をコントロールすることが可能であることが確認された。

発生運動ニューロンの任意の タイミングでの標識

発育鶏胚の脊髄運動ニューロンへ特異的に遺伝子導入ができる系を発展させるため、次に任意のタイミングで運動ニューロンへ遺伝子導入できるかの検討を進めた。運動ニューロン特異的なプロモ

ーター領域の一つである HB9 遺伝子のプロモーター領域に rtTA を連結し, tet 反応領域に目的遺伝子を配置した. このプラスミドを生体エレクトロポレーション法によって頸髄に導入して, 頸髄の運動ニューロン死が起こる時期に一致して細胞死関連遺伝子を頸髄運動ニューロンへ発現させた. この一連の実験によって我々はニューロン死の時期に一致して運動ニューロン特異的に遺伝子発現誘導を行うことに成功し, その蛋白の細胞死における機能解析に成功した⁵⁾. 通常であれば細胞死の起こる以前に目的遺伝子は発現しているはずで, 生体エレクトロポレーション法と tet-on 調節系を用いて理想的な遺伝子導入を行うことが可能であることを示した. また運動ニューロンが発生の任意の(形態形成の重要な)時期で標識できることを示すもので, 本手法が今後の研究に大いに役立つものと思われる.

これからの展望

生体エレクトロポレーション法はレトロウイルスとも組み合わせて用いることができ, RNAi や dominant-negative 変異体導入などと組み合わせることで, 内在性遺伝子の不活化に応用することも可能である. 遺伝子操作においても有効な手法が確立されつつあるニワトリ胚は今後ますます形

態形成を解析するモデルとして重用されることが期待される.

参考文献

- 1) Federspiel MJ and Hughes SH: Retroviral gene delivery. *Methods Cell Biol* 52: 179-214, 1997.
- 2) Sato N, Sakuma C, Kato H, Milligan CE, Oppenheim RW and Yaginuma H: Bcl-2 rescues motoneurons from early cell death in the cervical spinal cord of the chicken embryo. *J Neurobiol* 53: 381-390, 2002.
- 3) Sato N, Matsuda K, Sakuma C, Foster DN, Oppenheim RW and Yaginuma H: Regulated gene expression in the chicken embryo by using replication-competent retroviral vectors. *J Virol* 76: 1980-1985, 2002.
- 4) Muramatsu T, Mizutani Y, Ohmori Y and Okumura J: Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 376-380, 1997.
- 5) Sato N, Sakuma C, Sato Y, Gould TW, Oppenheim RW and Yaginuma H: Distinct susceptibility of developing neurons to death following Bax overexpression in the chicken embryo. *Cell Death Differ* 13: 435-445, 2006.