

カイコ脳への遺伝子導入およびボンビキシン遺伝子の発現に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16268

氏 名	本 賢 一
生 年 月 日	
本 籍	石川県
学 位 の 種 類	博士(理学)
学 位 記 番 号	博甲第329号
学位授与の日付	平成12年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	カイコ脳への遺伝子導入およびボンビキシン遺伝子の発現に関する研究
論文審査委員(主査)	岩見 雅史(研究科・助教授)
論文審査委員(副査)	櫻井 勝(理学部・教授) 東 浩(理学部・助教授) 山口 和男(遺伝子実験施設・教授) 山口 正晃(理学部・助教授)

学 位 論 文 要 旨

The insect brain consists of at most one hundred thousands cells, and therefore this simplicity of the brain is ideal for molecular study. We have established the gene transfer system into the insect brain by electroporation and microinjection to perform the gene expression analysis. A transgene reporter consisting of the bombyxin gene promoter and the green fluorescent protein coding region was introduced into intact brains of the silkworm *Bombyx mori*. After *in vitro* culture of the brains the fluorescence derived from the introduced reporter gene was observed in all cases in eight neurosecretory cells that had previously been identified as bombyxin-producing cells (BPCs). The expression was specific to BPCs, indicating that the reporter was under the control of the bombyxin gene promoter in a BPC-specific manner. A reporter series of deleted promoter suggested that the 188-394 bp upstream region of B3 gene coding region was essential for the BPC-specific expression.

Introduction of reporter gene by electroporation or microinjection was therefore found to be a suitable method for analyzing cell-specific expression in intact tissues and to be substitutable for the germ-line transmission of reporters in the transgenic system. Application of this technique enables us to analyze the cell-specific expression of transgene reporters within a few days and treat more than several dozens of the reporters within 1 month, which is difficult to do with the transgenic system.

1. はじめに

昆虫は無脊椎動物で最も発達した脳・神経系を持つといわれているが、脳を構成する神経細胞はわずか数万でしかない。それにも関わらず、億単位の神経細胞を持つ脊椎動物と同様の基本行動様式を幾つも持ち合わせていることから、昆虫は脳・神経系の研究におい

て非常に優れた実験動物といえる。なかでも、大型昆虫であるカイコの脳は比較的大きく実験的操作が容易であり、これまでに多くの神経生理学的データが蓄積されている。これらのデータを生かすべく、分子生物学的手法を用いた研究法の確立が望まれてきたが、個体への遺伝子導入法として有用なトランスジェニックシステムは、マウスや、ショウジョウバエなど限られた動物でしか確立されておらず、カイコに至っては未だに実用化されていない。最近になって、トランスポゾンpiggy Bacを利用したトランスジェニックカイコの作成法が報告されたが、その成功率は1%未満であり実用化されていない。また実用化されたとしても、このトランスジェニック体の作成過程は一般的には非常に複雑なものであり、多くの時間がかかるという短所を有する。そこで本研究では非トランスジェニック昆虫であるカイコの脳への遺伝子導入系を確立し、神経ペプチドであるボンビキシンの神経分泌細胞におけるの遺伝子発現調節機構を明らかにすることを試みた。

遺伝子導入法は現在までに多種多様のものが開発されているが、本研究ではエレクトロポレーション、およびマイクロインジェクションを用いた遺伝子導入系の開発を試みた。エレクトロポレーションやマイクロインジェクションによって組織に直接遺伝子を導入する場合には、一般的には1個の細胞あたり多コピーのDNAが導入され、また導入されたDNAは細胞内で徐々に分解されるため、導入された遺伝子は一時的に過剰発現されることとなり、安定な遺伝子発現を供給することは出来ない。そのため、これらの遺伝子導入法は遺伝子の機能解析に向いているとは言えないが、プロモーター解析など一過性のレポーター遺伝子の発現を検出することが目的である場合には有効な遺伝子導入法であると言える。また、これらの方法を利用した遺伝子導入はトランスジェニックシステムと比較した場合、短時間で多種類のレポーター遺伝子を導入することが可能であるという長所を持つ。

ボンビキシンはカイコ脳から単離されたインスリン様分子である。当初、前胸腺を刺激しエクジソンの産生・分泌を促進するホルモンとして単離・精製されたが、カイコ除脳蛹を用いた検定では前胸腺刺激活性を有さなかった。また高濃度のボンビキシン存在下で前胸腺を*in vitro*培養した場合、前胸腺でのエクジソンの分泌が促進されるが、生体内相当の濃度で培養した場合には促進されなかったことから、本物の前胸腺刺激ホルモンとは異なり、ボンビキシンにはカイコ生体内におけるエクジソン分泌を促進させる効果はないと考えられた。一方、その後の研究によりボンビキシン本来の生理活性としては、糖代謝や、培養細胞の形態変化、卵巣での減数分裂などへの関与が示唆されている。ボンビキシンの特徴の一つとして、その遺伝子発現部位のユニークさがあげられる。ヒトのインスリンの産生部位は膵臓のランゲルハンス島β細胞であるが、カイコのボンビキシン遺伝子の産生部位は脳中央部にある4対の神経分泌細胞である(図1A)。神経分泌細胞における細胞特異的発現のメカニズムに関しては高等動物でもほとんど知られておらず、ボンビキシン遺伝子のプロモーター解析を行うことにより、神経分泌細胞特異的発現のメカニズムに関する新たな知見が得られることが期待される。またボンビキシン遺伝子はカイコハプロイドゲノムあたり少なくとも32コピーの遺伝子が存在しているが、そのすべての遺伝子が発現しているわけではなくその発現様式は独特なものである。このことから、ボンビキシン遺伝子のプロモーター解析の結果は多重遺伝子族における発現調節機構のメカニズム解明にも貢献できることが期待される。

2. エレクトロポレーション法を利用したカイコ脳への遺伝子導入

カイコではすべての組織でアクチンA4遺伝子が発現していることから、このアクチンA4遺伝子に対するレポーター遺伝子を脳に導入すればDNA分子の導入部位がわかる。そこで、アクチンA4遺伝子プロモーターとGFP遺伝子からなるレポーター遺伝子pAct::EGFPをコントロールとしてエレクトロポレーション法によりカイコ脳への導入を試みた。実験手順は、まず20 μ g/5 μ lのプラスミドpAct::EGFP DNAに75 μ lのGrace's Insect's Cell Culture Mediumを加え、エレクトロポレーション用のDNA溶液とした。このDNA溶液80 μ lをギャップ2mmのマイクロスライド型電極の電極間に流し込み、カイコ5令3日目の幼虫頭部から外科的に摘出した脳をDNA溶液に浸した。ポンピキシン産生細胞のある脳側面をマイナス極側に向くように位置を調整した後、電圧50V、パルス幅50ミリ秒のパルスを5回与えた。in vitro 培養によりGFP遺伝子を発現させた後、蛍光顕微鏡により観察したところ脳表面の細胞群でGFP由来の蛍光が確認された。これらのことからエレクトロポレーション法を用いて遺伝子を導入した場合、レポーター遺伝子は脳表面の細胞群にランダムに導入されることが分かった。一方、ポンピキシン遺伝子C4/B3スペーサーとGFP遺伝子からなるレポーターpC4B3::EGFPを作成し、前述のpAct::EGFPの場合と同様にエレクトロポレーション法により各々をカイコ5令3日目の幼虫の脳へ導入したところ、ポンピキシン産生細胞における細胞特異的なGFPの発現が確認された(図1B)。pAct::EGFPを導入した時の結果から、エレクトロポレーションによりpC4B3::EGFPは脳表面の細胞群にランダムに導入されていることが予想されるが、GFPを発現している細胞はポンピキシン産生細胞だけであったことから、C4/B3スペーサー内にポンピキシン産生細胞における細胞特異的発現を司る転写エレメントが存在することが示唆された。

エレクトロポレーションの利点としては望みのステージの標的組織に簡単に遺伝子導入が出来ることや、迅速にレポーター遺伝子の発現を確認することができるという点があげられる(表1)。本研究においても、カイコ5令幼虫や蛹0日目などの様々なステージの脳にpB3::EGFPの導入を試みたが、いずれの場合も簡単に発現解析を行うことができた。一方、ショウジョウバエ等で頻りに用いられているトランスジェニックシステムを利用した遺伝子導入法では、遺伝子導入から発現解析に至るまでに非常に複雑な操作と時間が必要であり、本実験系のように遺伝子導入2日後に発現解析を行うということは不可能である。

3. エレクトロポレーションによる遺伝子導入の最適条件

電極間の発生熱量が同じ値であれば、遺伝子導入効率もほぼ同じになることが報告されている。発生熱は電圧と、電圧負荷時間、電極間の抵抗値によって決定されることから、エレクトロポレーション時の最適条件を決定するにあたって、電極間の抵抗値にも注目した。実際にDNA溶液として抵抗値の異なるInsect's Cell Culture Mediumを用いた場合では、電圧、電圧負荷時間、パルスの回数を固定した場合でも導入効率に違いが見られた。そこで、本実験系における発生熱と導入効率について検証した。この結果、本実験系では遺伝子導入効率にはばらつきがあるものの、全体的な傾向としては0.1J~0.4Jにかけて発生熱が増加するにしたがい導入効率が増加することがわかった。また、発生熱が0.5J以上になると導入効率の低下が見られた。以上の結果から、発生熱が約0.4Jになるように条件を設定すれば、導入効率が最も高くなることがわかった。また、最適発生熱を

0.4Jと固定することにより、あらかじめ電極間の抵抗値を測定すれば、前もって最適電圧を算出することが可能である。Q: 負荷時間あたりの発生熱 (J)、電圧 (V)、負荷時間 (秒)、R: 抵抗 (Ω) とした場合、発生熱量の近似式は

$$Q=V^2 \cdot T / (4.2 \times R)$$

であるから、 $Q=0.4$ 、 $T=0.05$ とすると最適電圧は以下のようなになる。

$$V=\sqrt{33.6R}$$

以上のように遺伝子導入効率が最適となるような電圧は簡単に求めることができるようになったが、その一方で発熱量がある程度高くなると脳にダメージによる自家蛍光が生ずるという問題点が生じてきた(表1)。エレクトロポレーション時の熱による脳のダメージは導入した遺伝子の発現に影響を与えるであろうし、またレポーターであるGFPの蛍光輝度を測定する場合にも多きな支障となる事が予想される。この点を考えると最も理想的な条件は遺伝子導入効率が比較的高く、かつ自家蛍光も押さえられるという条件であるが、残念ながら本研究においてはそのような条件を見つけることができなかった。そのため現段階においては、エレクトロポレーション法はプロモーター解析を目的とした遺伝子導入法としては不適であると判断した。

4. マイクロインジェクションを利用したカイコ脳への遺伝子導入

マイクロインジェクション法では操作が複雑なため短時間に多くの脳に遺伝子導入ができないなどエレクトロポレーション法に比べ短所も多いが、最大の利点は狙った細胞に導入でき、かつ*in vitro*培養後でもほとんど脳に自家蛍光が見られない点である(表1)。特にW-MNIBA (GFP検出用) やW-MWIY (テキサスレッド検出用) の2つのミラーユニットではともにほとんど脳で自家蛍光は見られないため、導入するDNA溶液にテキサスレッド標識DNAを混合しておくことにより、蛍光顕微鏡下で遺伝子導入の正否を簡単に検定することができる。そこで本研究では、遺伝子導入の正否をテキサスレッドの蛍光による検定で、プロモーター活性をGFPの蛍光輝度で検定することにより、ポンピキシンB3遺伝子のプロモーター解析を行った。4種類のpC4B3変異体をカイコ脳に導入し検定を行ったところ、B3遺伝子翻訳開始点より上流-184~-388bpの領域にB3遺伝子の発現に必要な転写エレメントが存在することが示唆された。この領域内のDNA配列とオス蛹0日目の頭部での発現が確認されているポンピキシンA6遺伝子およびC1遺伝子の上流配列と比較したところ、14塩基からなる相同性の高いDNA配列(以後エレメント ω)が存在することが分かった。また以後エレメント ω と78%以上の相同性をもつDNA配列が既知のポンピキシン遺伝子のうち、D1遺伝子およびE1遺伝子を除く30の遺伝子の上流域に存在していることから、エレメント ω がポンピキシン遺伝子の発現になんらかの役割があることが示唆された。

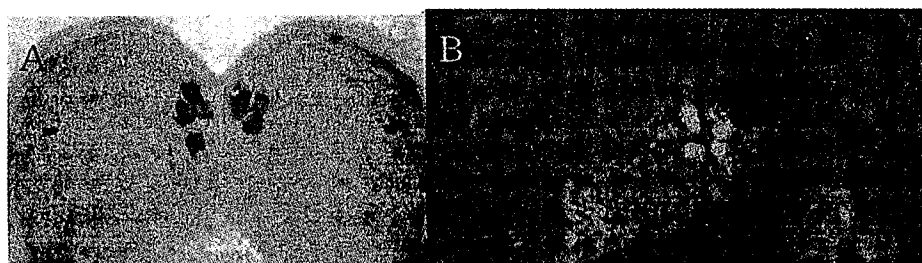


図1 A：ホールマウント*in situ*ハイブリダイゼーションによりカイコ幼虫脳におけるポンピキシン遺伝子発現細胞を同定した結果。ポンピキシン遺伝子は中央部に位置する4対の神経分泌細胞で特異的に発現している。B：C4B3::EGFPをエレクトロポレーション法によりカイコ幼虫脳に導入し、2日間の*in vitro*培養後に蛍光顕微鏡で観察した結果。計5個（左2個、右3個）のポンピキシン産生細胞でGFPの蛍光が見られた。

表1 エレクトロポレーション法とマイクロインジェクション法の比較

	エレクトロポレーション	マイクロインジェクション
長所	<ul style="list-style-type: none"> ①操作が簡単である。 ②一度に多くの脳に導入可能である（30～40個/1時間）。 	<ul style="list-style-type: none"> ①必要なDNA量は比較的少量である。 ②蛍光色素を用いることにより組織中における導入部位の確認可能である。 ③自家蛍光がほとんどでない。
短所	<ul style="list-style-type: none"> ①比較的大量のDNAが必要である。 ②ねらった部分への導入が困難。 ③導入部位の確認が困難である。 ④自家蛍光を生ずる。 	<ul style="list-style-type: none"> ①熟練が必要である。 ②短時間に多くの脳を導入できない（約10個/1時間）。

学位論文審査結果の要旨

提出論文の評価と平成12年2月3日に行われた学位申請者の口頭発表および質疑応答の結果をふまえて審査を行い、同日開催の審査委員会において以下の通り判定した。

本論文は、昆虫脳への遺伝子導入法の開発とそれを応用したボンピキシン遺伝子のプロモーター解析の結果を記述したものである。特に、遺伝子導入法の開発はこれまでトランスジェニック系が利用できないためレポーター遺伝子を使った発現解析を行うことができなかった多くの動物種での遺伝子発現解析系を確立したもので、その意義は大きい。本論文による、具体的な研究成果は以下の通りである。

カイコガ幼虫脳への遺伝子導入法およびに関して、ボンピキシンB3遺伝子プロモーターの発現解析に関して、以下の成果が得られた。

- 1) エレクトロポレーション法による遺伝子導入系の確立。これまで様々な系でエレクトロポレーションによる遺伝子導入が行われてきたが、いずれも細胞や組織での異所的発現や大量発現のためであった。エレクトロポレーションを本研究に見られるようなレポーター遺伝子を用いた脳での細胞特異的発現に応用したのは初めての試みであり、このような実験系が可能であることを示した。
- 2) マイクロインジェクション法によるレポーター遺伝子発現解析の半定量系を確立した。
- 3) 4種類のボンピキシンB3レポーター遺伝子変異体をカイコガ幼虫の脳に導入した結果、B3遺伝子の翻訳開始点上流-184~-388bp領域にボンピキシン細胞特異的発現(ボンピキシン遺伝子はカイコガ脳の背側中央部の4対の神経分泌細胞で発現している)のための転写エレメントが存在することを示した。
- 4) ボンピキシンB3遺伝子翻訳開始点上流-184~-388bp領域の塩基配列を他のボンピキシン遺伝子の上流配列と比較したところ、14塩基からなる相同性の高い配列の存在を明らかにした。

以上、本論文は昆虫脳への遺伝子導入とそれを利用した遺伝子プロモーター解析を記述したものであり、本論文に示された方法論は昆虫にとどまらずトランスジェニック系を有しない動物組織や個体への適応も可能である。すなわち、本論文により、トランスジェニック系を用いない遺伝子発現解析系の一つが確立したと判断され、高く評価される。以上の結果、本論文は博士(理学)に値すると決定した。