

ケージドmRNA技術とノックダウン法による前脳形成遺伝子間相互作用の解明

●安藤 秀樹 ◆岡本 仁

理化学研究所脳科学総合研究センター

＜研究の目的と進め方＞

脊椎動物の終脳形成機構を遺伝子間相互作用の側面から解明するため、第一の目的として胚発生の観察と操作に適した小型魚類ゼブラフィッシュを用いて新規手法である6-bromo-4-diazomethyl-7-hydroxycoumarin (Bhc-diazo)によるメッセンジャーRNAの試験管内ケーシングと紫外線照射による生体内アンケーシング技術を開発し、任意遺伝子の時空間特異的発現誘導を可能にする。第二段階として本技術を応用し前脳形成において機能的関連が示唆される2種の遺伝子間のエピスタシスを明らかにする。具体的には一方の遺伝子(A)に対応するmRNAをBhc-diazoでケージし、他方の遺伝子(B)に対応するアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド(AMO)とともにゼブラフィッシュ胚にマイクロインジェクションにて導入する。前脳形成期(受精後12時間)に予定終脳域に半径36マイクロメートルの紫外線をスポット照射し、遺伝子Aを終脳で過剰発現させ、遺伝子BのAMOによる機能阻害効果を救済するかを観察する。もしレスキューが確認され、同時に遺伝子BのmRNAアンケーシングが遺伝子AのAMO効果をレスキューしなかった場合、遺伝子AはBの機能的下流に位置すると考えられる。この方法を用いて、終脳形成に関与する遺伝子群の機能的相互関係を順次明らかにしていく計画である。

＜研究開始時の研究計画＞

(研究計画1) 発現プラスミドのケーシングとアンケーシングによるコンディショナルな遺伝子発現誘導

ゼブラフィッシュ胚でのコンディショナルな遺伝子発現誘導系の開発のため、Bhc-diazoを用いてまず組織特異的発現をもたらすプロモーターの下流にレポーター遺伝子をつないだ発現プラスミドをケージした後受精卵に注入し、発生初期に全細胞を紫外線照射しレポーター遺伝子の転写を誘導する。導入したプロモーター特異的な遺伝子発現が効率的に誘導されるよう反応条件の最適化を試みる。

(研究計画2) メッセンジャーRNAのケーシングとアンケーシングによるコンディショナルな遺伝子発現誘導

次に翻訳段階での遺伝子発現誘導系の確立のため、試験管内で合成したレポーター遺伝子に対応するmRNAをBhc-diazoにてケージし、受精卵に注入後特定の発生段階まで培養する。頭部形成が開始される受精後12時間の時期に独自に設計した紫外線スポット照射装置を用いて予定前脳領域に局限したアンケーシングを行い、終脳特異的な翻訳誘導が可能な反応条件の最適化を試みる。

(研究計画3) メッセンジャーRNAのアンケーシングとアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド(AMO)の併用による機能関連遺伝子間エピスタシスの決定

前脳形成過程で発現プロファイルや過剰発現効果が類似したパターンを示す2種類の転写制御因子遺伝子AとBを用いて、一方のmRNAに対応するAMOと他方のケージドmRNAを受精卵に共注入し頭部形成期まで培養後予定前脳領域にアンケーシングを行い、一方の遺伝子機能が

抑制された条件下で過剰発現を誘導する。両遺伝子間に直接的な機能的上下関係(エピスタシス)が存在する場合、例えば遺伝子Aの機能抑制下で遺伝子Bの過剰発現の結果Aの抑制効果が救済され、かつ逆の組み合わせではBの抑制効果が救済されなかった場合、遺伝子Aの機能は遺伝子Bの機能の上位に位置付けられることとなる。この戦略を機能的関連が予想される遺伝子間での組み合わせで繰り返すことによって、前脳形成に関与する遺伝子間の機能的ネットワークが順次明らかになっていくと期待される。

＜研究期間の成果＞

(研究計画1)

論文リスト1：発現ベクターのケーシングによるコンディショナルな遺伝子発現の誘導は最適反応条件の決定により成功をおさめた。a-アクチンプロモーター支配下で発現する緑色蛍光タンパク(GFP)遺伝子をBhc-diazoでケージしゼブラフィッシュ受精卵に注入後培養し、初期胚の時期に全細胞に紫外線を照射しアンケージした結果、予想通り稚魚の体壁筋に特異的なGFP蛍光が観察された。その発現様式はモザイクではあったが、本成果により適切なプロモーターを利用することで目的の組織に特異的に任意の遺伝子の発現を誘導することが可能であることが証明された(図1；左：アンケージされた胚。右：ケージ状態のままの胚)。

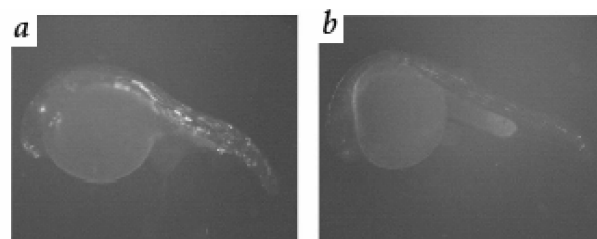


Fig. 7 Photo-activation of Bhc-caged DNA in vivo. Embryos 24 h after fertilization injected with caged α -actin-GFP plasmid DNA at the one-cell stage that received illumination with ultraviolet light over the entire region of the animal pole at the beginning of gastrulation (a) or did not receive illumination with ultraviolet light (b).

(研究計画2)

論文リスト1、2、3：任意の遺伝子に対応するメッセンジャーRNAの試験管内でのケーシング条件も決定することができた。合成したレポーター遺伝子(GFP遺伝子と β -ガラクトシダーゼ遺伝子)に対応するケージドmRNAを受精卵へ注入し、まず初期胚の時期に全細胞へアンケージを行った結果、効率的にGFPおよび β -ガラクトシダーゼの発現が誘導された(図2)。

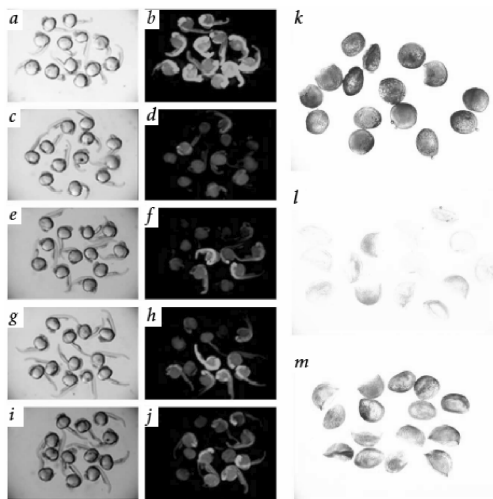


図2 a,b;Intact GFP mRNA注入胚. c,d:ケージドGFP mRNA注入胚. e-j:3通りの線量で紫外線照射によるアンケージを受けたGFP mRNAの胚での発現. k-m:b-ガラクトシダーゼmRNAの胚での発現. k:Intact mRNA注入胚. l:ケージドmRNA注入胚. m:アンケージを受けたmRNAの胚での発現.

さらに、より発生後期の胚の予定頭部への局所的アンケージでは両遺伝子とも頭部に特異的な発現を示した(図3)。

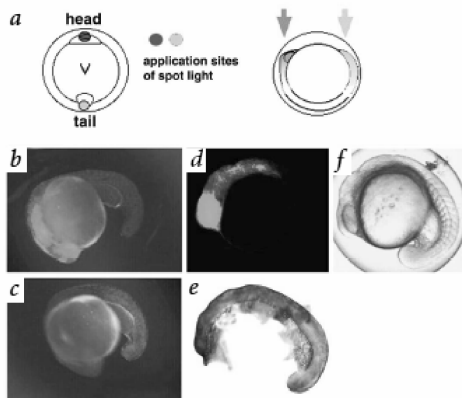


図3 b,d: 頭部特異的mRNAアンケージによるGFPの発現.

この成功をうけて、転写制御因子である *Engrailed2a* の mRNA をケージし受精卵に注入後、培養した胚の頭部でアンケージした結果、中脳領域の発生が著明に促進された一方、終脳および間脳の領域が吻側に押し出される形で駆逐された(図4、論文リスト1)。

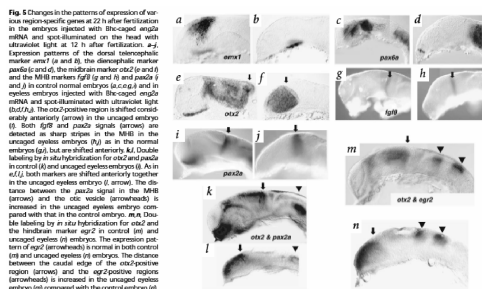


図4 前脳マーカー遺伝子発現による *Engrailed2a* 過剰発現による中脳領域の過剰形成.

本結果により生体内で非侵襲的に頭部に過剰発現した *Engrailed2a* は中脳領域の確保と発生に極めて重要な役割を担うことが明示された。次に、mRNA ケージング技術にさらなる改良を試みた。当初開発した条件では、合成したケージド mRNA は水溶液の状態受精卵に注入していた。この方法であっても充分なアンケージ効果が得られた反面、生体内で紫外線によらない Bhc 基の解離が原因と思われる発現の「漏れ」が認められた。この問題を克服すべく、ケージド mRNA を Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 溶液の状態で注入するアイデアを試みた。その根拠は、生化学的知見によれば DMSO は細胞内で内在性のフォスファターゼ活性を阻害し、エステル結合の安定化に貢献することが報告されていたからである。この改良を試みた結果、ケージした mRNA からの発現の「漏れ」は著明に減衰した(図5)。

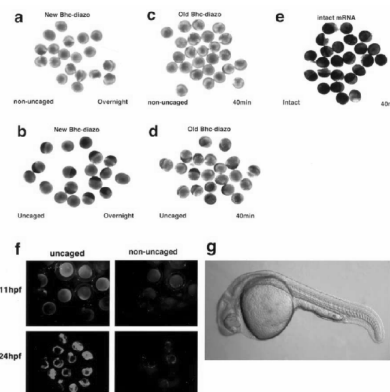


図5 a,b; b-ガラクトシダーゼ mRNA のアンケージ効果. f,g; GFP mRNA のアンケージ効果.

このことは予想通り DMSO が細胞内で Bhc 基と mRNA のリン酸基との間の P-O 結合の安定化に貢献した結果であると思われた(論文リスト3)。

(研究計画3)

論文リスト4、5: ケージド mRNA を用いた前脳特異的な遺伝子発現とゼブラフィッシュで遺伝子機能の抑制に用いられているアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド(以下AMO)の併用による機能関連遺伝子間のエピスタシス決定実験を立案、実行した。

(以下論文リスト5) 前脳形成において、2種の転写制御因子、*Lhx2* と *Six3* はその発現パターン、発現作用の両面で類似した特徴を持つことがわかった。そこで、最初に *lhx2* 遺伝子の mRNA をケージし *six3* に対する AMO と一緒に受精卵に注入した。受精後12時間まで培養した胚の予定前脳領域に局所的アンケージ操作を行い *Lhx2* の発現を誘導したところ、*Six3* の機能阻害を受けた胚特有の頭部形成不全の形質が完全にレスキューされた(図6)。

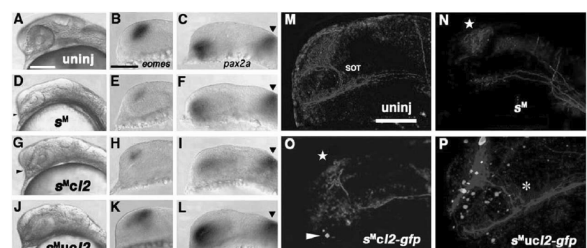


図6 *Lhx2* mRNA のアンケージによる *Six3* 阻害効果の救済.

組織化学的解析の結果、レスキューされた胚の前脳領域の細胞数および分裂中の細胞数はともに正常胚より著明に増加していた（図7）。

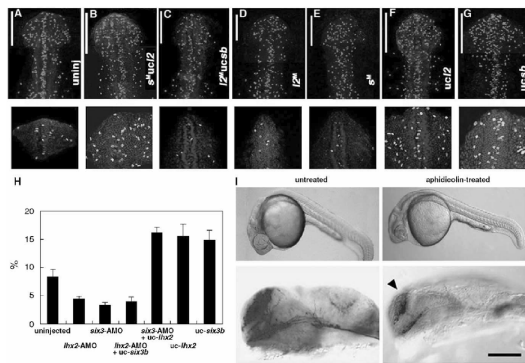


図7：A-G;正常胚、レスキュー胚、非レスキュー胚、Lhx2,Six3機能阻害胚の前脳内分裂細胞の分布。H:lhx2 mRNAアンケージによるレスキュー胚での細胞分裂の過剰促進。

これはSix3やLhx2それぞれ単独でアンケージした場合の特徴と一致する。また、免疫組織化学的に前脳内の初期ニューロンの発生を観察した結果、レスキュー胚ではやはりSix3やLhx2単独のアンケージを受けた胚同様、終脳ニューロンの数が著明に増加していた。ただし興味深いことにレスキュー胚、Lhx2アンケージ胚はともに正常なパターンで前脳のマーカー遺伝子を発現しており、さらに初期ニューロンの分布、軸索走行とも正常なパターンであった（図8）。

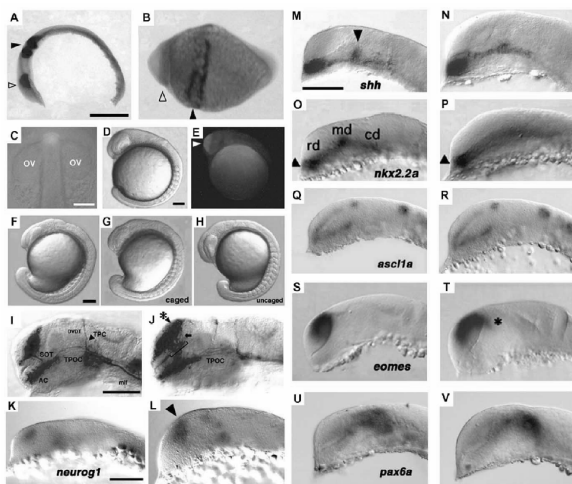


図8：M-V:正常胚と比較したLhx2アンケージ胚での前脳マーカー遺伝子の正常な発現パターン。I,J:正常胚と比較したLhx2アンケージ胚での終脳ニューロンの過剰形成

以上の結果は1) Lhx2は機能的にSix3の下流に位置する。2) Lhx2が介在する経路では正常なパターンを損なうことなく細胞分裂と神経分化を促進する、の2点の結論を推察させる。

そこで上記の可能性を検証すべく対極実験を行った。その結果、Six3の前脳での過剰発現誘導ではLhx2の機能阻害形質である前脳形成不全を全くレスキューできないことが判明した（図9）。

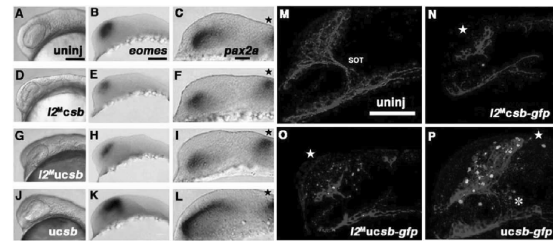


図9：six3 mRNAのアンケージによるLhx2機能阻害効果に対する救済効果の欠如。

以上の結果を統合し、我々は次の結論に到達した。1) Lhx2は前脳形成においてSix3の機能的な下流に位置する。2) Six3はLhx2を介在因子として前脳成長において細胞分裂の促進のみならず神経分化に対しても正の働きをなす。3) Six3-Lhx2経路は前脳におけるパターン形成機構とは機能的に独立している。

以上の成果をもって、旧特定領域研究「統合ゲノム」での研究課題に設定したすべての研究目的を達成した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

研究計画1、2については世界初のメッセンジャーRNAのケーシング反応系の確立と生体内での局所的アンケージを介した時空間特異的な遺伝子発現技術の完成ということもあって、成果発表と同時に世界的な反響があった。特に欧米諸国からの問い合わせは予想以上に多く、この実験系への関心の強さを実感させた。そのため多くの研究者からの要望に応え、2002年に理化学研究所・脳科学総合研究センターにて国際ワークショップの開催を呼びかけたところ海外から約30名の参加があり、積極的な論議が交わされた。また、同年University College LondonのStephen Wilsonの研究室に招かれ、mRNAケーシング技術のデモンストレーションと基調講演を行った。さらに同大学からの留学生に対し指導担当教官としてmRNAケーシング技術の指導を行い、その技術を完全に習得させた。また本技術は「遺伝子発現調節方法」として国際特許申請中であるが、唯一ライセンスに消極的であらシンガポール政府からのクレームに対しても反論提示中であり、近く認可される見込みである。なお、先立って認可された国際特許であるBhc-diazio合成法は現在和光純薬工業株式会社より販売中である。

また、論文リスト1での成果発表は理化学研究所からプレスリリースされ以下のマスメディアを介して大きく報道された。

マスメディア報道

1. 日本経済新聞（平成13年7月24日；首都圏版夕刊. 同7月25日；全国版朝刊社会面）「遺伝子の働き制御自在」
2. 朝日新聞（平成13年7月25日；首都圏版夕刊. 同7月26日；全国版朝刊社会面）「狙った遺伝子だけ働かせる技術開発」
3. 読売新聞（平成13年8月6日；首都圏版夕刊. 同8月7日；全国版朝刊社会面）「遺伝子機能 魚で解明へ」
4. 日本工業新聞（平成13年9月26日. 特集「甦れニッポン 科学技術創立国へ」）「魚の脳を解明、遺伝子を制御～突然変異探り難病治療にも～」
5. 日経バイオテク（平成13年7月30日）「理研、東邦大

光照射で時期・部位特異的な遺伝子の強制発現手法を開発」

6. NHKニュース（平成13年 テレビ全国版）

さらに、科学ジャーナリスト立花隆氏から大きな関心をよせられ、本研究成果についての脳科学総合研究センター長へのインタビューはセンター機関誌「BSI NEWS」で大きく取り上げられた。

研究計画3については成果発表（文献リスト5）が2005年末と発表直後であるにも関わらずlhx2遺伝子分子のリクエストが海外から数件きているので今後の反響が期待される。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

mRNAケーシング技術についてはその化学的精密な特性上、試行ごとに全く同じ反応条件を再現することが難しかった。しかし2005年に和光純薬工業から高純度のBhc-diazoが大量に市販されるようになってから安定した結果が得られるようになった。このことは本技術を普及させる上で極めて重要なことである。次に本技術を応用しアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド (AMO) と併用することで極めて効率的な遺伝子エピスタシス決定法を開発し、脊椎動物の脳容積を規定する中核的遺伝子機構の候補であるSix3-Lhx2経路の発見に至った。この成果に示される通り、mRNAケーシング技術の開発に発した本研究課題はその後の継続的な発展研究の結果、生物の生体構築に関わるゲノムネットワークの解析に飛躍的効率化をもたらす画期的な実験系の確立に至った。このことは「統合ゲノム」研究計画に4年間連続して採択されたことによるものであり、深く感謝している。

〈今後の課題〉

mRNAケーシング／アンケーシング技術はゼブラフィッシュの初期発生における遺伝子発現誘導に極めて有効な実験系であるが、本技術の化学的性質上、以下の2点で適用の制約を受ける。

1) 有効な遺伝子機能抑制手段であるAMOはリン酸基がブロックされているためBhc基を結合することができない。そのため si-RNAのケーシングが有力なコンディショナル遺伝子ノックダウンの手段と考えられる。

2) mRNAのアンケーシングは表皮が肥厚化するふ化前後の発生後期の個体には紫外線透過率の極端な低下のため適用できない。

これら2点の課題を同時に解決する新規手法を2005年に完成し論文印刷中である。この近日発表予定の技術の適用により、コンディショナルな遺伝子ノックダウンはもちろん、局所的な部位での同時な遺伝子発現誘導／発現阻害誘導による特定組織形成における遺伝子機能ネットワークの解明も飛躍的に発展すると期待する。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. 0111091512

Ando, H., Furuta, T., Tsien, R. Y., and Okamoto, H., Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos, *Nature Genetics*, 28, 317-325 (2001).

2. 0403261905

Ando, H., and Okamoto, H., Practical procedures for ectopic induction of gene expression in zebrafish embryos using Bhc-diazo-caged mRNA, *Methods in Cell*

Science, 25, 25-31 (2003).

3. 0602031559

Ando, H., and Okamoto, H., Photo-mediated gene activation by using caged mRNA in zebrafish embryos, *Methods in Cell Biology*, 77, 159-171 (2004).

4. 0403261841

Okamoto, H., Hirate, Y., and Ando, H., Systematic identification of factors in zebrafish regulating the early midbrain and cerebellar development by ordered differential display and caged mRNA technology, *Frontiers in Bioscience*, 9, 93-99 (2004)

5. Ando, H., Kobayashi, M., Tsubokawa, T., Oyemura, K., Furuta, T., and Okamoto, H., Lhx2 mediates the activity of Six3 in zebrafish forebrain growth, *Developmental Biology*, 287, 456-468 (2005).

2) データベース

1. Full length sequence of zebrafish lhx2 cRNA: Genbank accession number; AB188255)

2. Full length sequence of zebrafish lhx9 cDNA: Genbank accession number, AB188254)

3) 国際特許

「遺伝子発現調節方法」出願番号：特願2001-124452
発明者：岡本仁、安藤秀樹、古田寿昭。出願人：理化学研究所。

関連ライセンス供与：和光純薬工業株式会社 (2005年)。