



形態形成遺伝子の経時・領域 特異的発現操作

(研究課題番号 15570175)

平成 15 年度～平成 16 年度

科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）

研究成果報告書

平成 17 年 3 月

研究代表者 竹 島 一 仁

(名古屋大学アイソトープ総合センター 助教授)

はしがき

文部科学省科学研究費（基盤研究(C)(2)）による「形態形成遺伝子の経時・領域特異的発現操作」は、平成 15 年に発足し、本年をもって終了したので、2 ヶ年にわたる研究成果をまとめて報告する。なお、研究成果は国際学会などで発表したものでそれらの抄録資料を添付した。

平成 17 年(2005 年)3 月

研究代表者 竹島一仁

研究組織

研究代表者： 竹島一仁(名古屋大学・アイソトープ総合センター・助教授)

研究経費

平成 15 年度 1,800 千円

平成 16 年度 1,400 千円

計 3,200 千円

名古屋大学図書



20118952

研究発表

(1) 口頭発表

1. 竹島一仁

イモリ胚への遺伝子導入

日本動物学会第 75 回大会(甲南大学、神戸：9 月 10-12 日)

シンポジウム招待講演：日本から発信する次世代モデル生物アカネズミ・メダカ・イモリ　ー実験モデル生物から野生種モデルへー

2. Kazuhito Takeshima

Gene delivery of the Spemann organizer by electroporation

10th International Xenopus Meeting (Marine Biology Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA, 2004.9.14-18)

研究成果

アフリカツメガエル神経板期以降の器官形成解析に独自の実績を持つエレクトロポレーション法を改良し、原腸陥入期前後の大型で脆弱な表層部および深部細胞にも改変遺伝子や細胞系譜マーカーなどの安定導入が可能になった。また発生後期の肢芽や、予定臓器域にもその適用範囲を拡張できた。

初期胚に関しては、約百ミクロン単位で導入領域調節が可能になり、処理後数時間で発現細胞群の同定や当該遺伝子の効果を観察できる。胚軸および誘導モデルを提唱する殆どの研究グループが初期卵割期割球への微注入法による遺伝子導入を行っており、微注入後陥入開始時までの解析対象時間外における当該遺伝子の発現による副次効果、平行して起こる細胞移動や細胞混合による解析精度低下や実験結果誤解の可能性は否めない。本研究では原腸陥入期前後の時期に限定して BMP、Wnt、FGF 関連遺伝子群の Gain and Loss of Function 実験および細胞系譜解析を行い、厳密な時期および領域特異的な軸形成・予定運命決定に関わる因子群の同定、相関解析が可能となった。その成果はイモリ胚を含む両生類にとどまらず哺乳類等を含む原腸陥入機構および形態形成、器官形成研究に大きく貢献する。

アフリカツメガエルのゲノム基盤情報の蓄積が進む一方、Spemann オーガナイザーを基点にした胚軸および胚葉誘導モデルについて国際的に再検証が進行している。我々が当該研究の技術的基盤としてエレクトロポレーション法を開発・改良し、本技術の摘要時期を原腸陥入期にまでさかのぼれたことは国内外の研究グループに先んずることになり、胚軸モデルおよび胚葉誘導モデルの新展開の契機になると期待される。

指肢形成における分泌性因子群の作用特性について、St. 51~55 胚の後肢芽に BMP および Noggin を導入し、前後軸に沿った指形成欠損を観察した。一方、Shh の肢芽前方域導入では過剰指形成や関節多岐化が観察された。これらの成果を基に、当該研究の拡張として腎予定組織、皮膚真皮層への各種遺伝子コンストラクト導入を行い、臓器形成および臓器再生を標的とした研究に着手している。

自己評価と今後の展望

ここ数年、Spemann オーガナイザーを基点にした従来の背腹軸が頭尾軸であり、従来の動物極植物極軸が背腹軸に対応するというモデルが提唱され、オーガナイザーが裏打ちする外胚葉および対峙位置にある腹側中胚葉における誘導現象についても幾つか修正案が報告されている。これは細胞系譜マーカー実験の高精度化がひとつの端緒になる一方、標識化する発生時期、着眼するマーカー遺伝子やその組織特異性を再吟味できる実験法の確立が待望されていることを意味する。本研究では独自技術開発により、意外なほど単純かつ直裁に初期原腸胚そのものを対象にして軸形成・予定運命決定を解析・考察することが可能になった。このことは従来欠落していた発生時期の解析データを確実に補完できるだけでなく、両生類原腸陥入機構研究の新規テーマ起案につながる。また今後、脊椎動物全体の原腸陥入時における軸形成理論の枠組み創生に寄与することが期待される。

さらに、発生後期の臓器形成研究にも本方法が適用可能なことが明らかとなり、遺伝子発現解析の強力なツールとして、形態形成・再生研究の分野および他のモデル動物系にも適用できると確信している。

謝 辞

我々が開発した初期胚へのエレクトロポレーション法に着目し、新たな実験系への拡張を多面的に支持して下さった、上野直人博士(岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所発生生物学研究系・教授)および故 村松達夫博士(名古屋大学大学院生命農学研究科・教授)に深く感謝致します。

[From Model Laboratory Species to Model Wild Species; the Next Generation of Model Animals Derived from Japan, but Applicable Worldwide: Japanese Wood Mouse, Japanese Medaka, and Japanese Newt]

Organized by Makoto Asashima¹, Hiroshi Mitani², Shin-ichi Abe³ and Tsuneo Sekijima⁴

¹Department of Life Science, ICORP/JST project, The University of Tokyo, ²Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, ³Department of Biological Science, Faculty of Science, Kumamoto University, ⁴Graduate School of Science and Technology, Niigata University

Gene Delivery into Newt Embryo

Kazuhito Takeshima

Radioisotope Research Center, Nagoya University, 464-8602, Japan

Newt embryos have been used for studies of induction and morphogenesis because of their accessibility and manipulability at all stages of development. Recent "Renaissance of Regeneration" also pays great attention to newt. However, use of newt embryos has been limited by the absence of a system for temporally and spatially controlled manipulation of developmentally important genes. The common RNA/DNA injection at the cleavage stages has only been marginally successful as their rather nonspecific expression, especially after the mid-blastula transition.

Here we show the improved electroporation method for newt embryo. Electroporation allows temporally and spatially controlled delivery of genes, and their expression reached their peaks within 0.5-1 day after electroporation. Targeting the dorsal lip at the early gastrula stage with pCMV-GFP plasmid resulted in the expression of GFP protein along with axial mesoderm, as for the neuro-ectoderm at the neural plate stage neural tube was labeled. Misexpression of BMP4 at the head organizer gave rise to the small- or pine-head phenotype, and at trunk/tail organizer the delivery of BMP disturbed the formation of the posterior central nervous system. The electroporation of BMP4-mRNA into the head neural fold inhibited the migration of a certain group of neural crest cells and the embryo lost its gill on the side of the electroporation. We also introduced the antagonist of BMP, Noggin, into the same regions. The delivery of noggin into the dorsal lip made the double-tail-fin phenotype, contrary to our expectation of a big-headed embryo.

This technique we have developed can expand the gain-of and loss-of-function approaches at specific regions or certain developmental stages of newt embryos. It also makes enable to trace the cell lineage of a certain organ during newt morphogenesis.

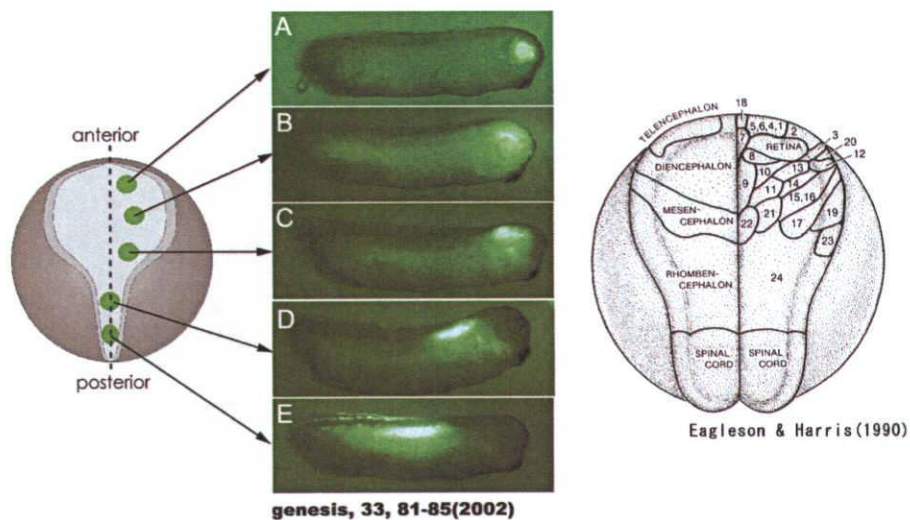
REFERENCES

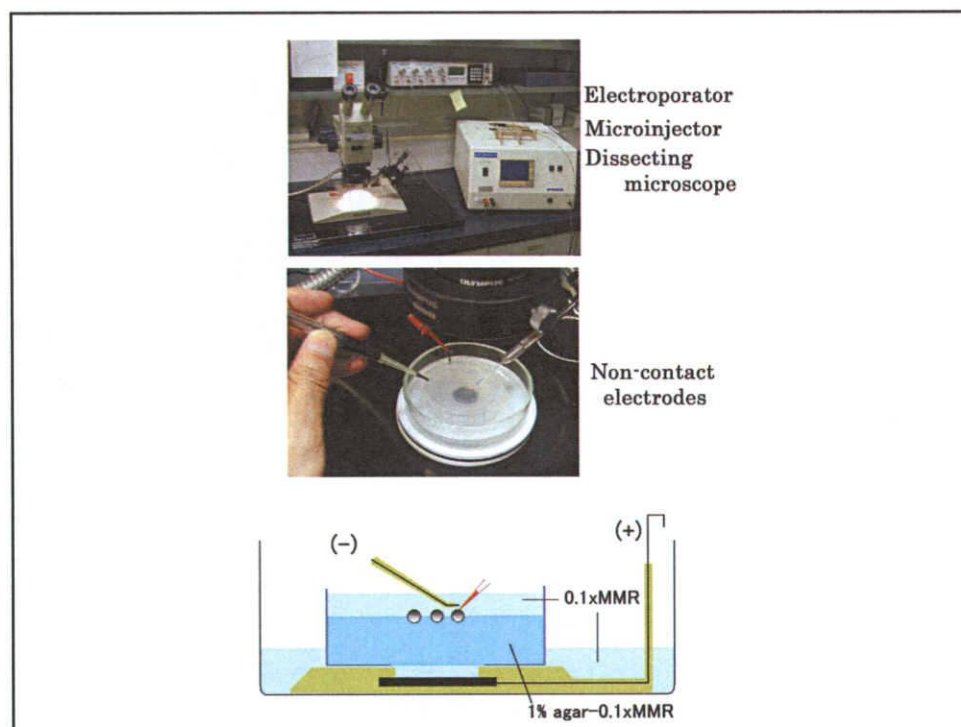
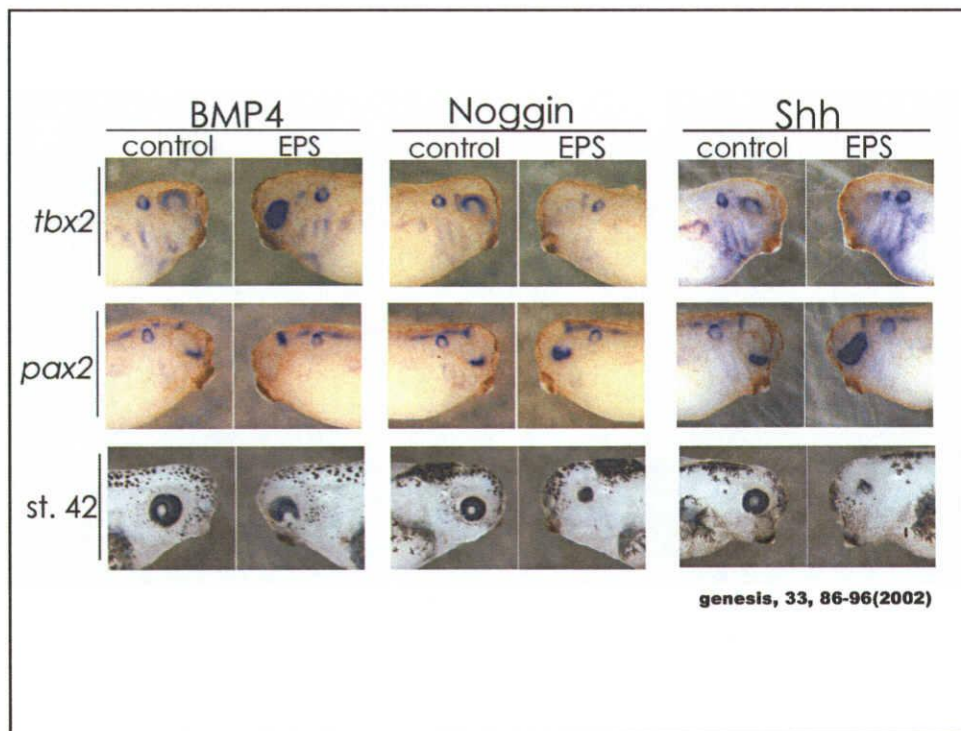
- (1) Improved mRNA electroporation method for *Xenopus* neurula embryos. *Genesis* 33: 81–85, 2002
- (2) Axes establishment during eye morphogenesis in *Xenopus* by coordinate and antagonistic actions of BMP4, Shh, and RA. *Genesis* 33: 86–96, 2002

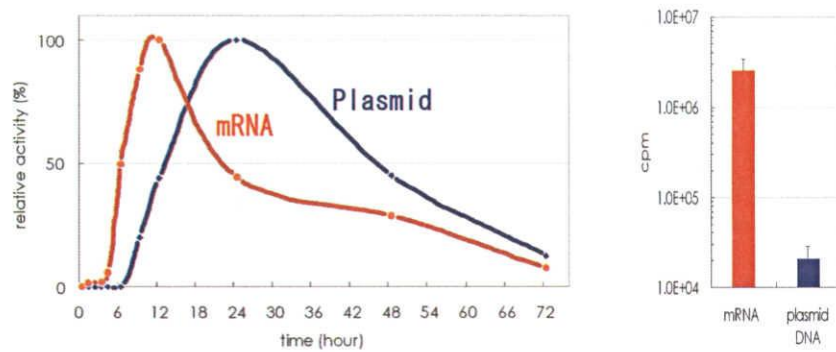
イモリ胚への遺伝子導入

竹島一仁

名古屋大学アイソトープ総合センター

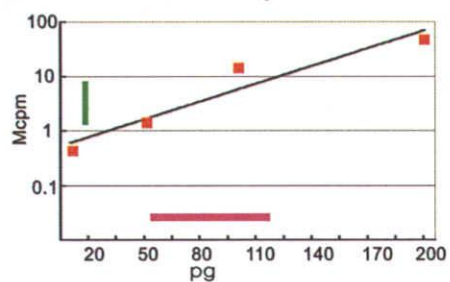




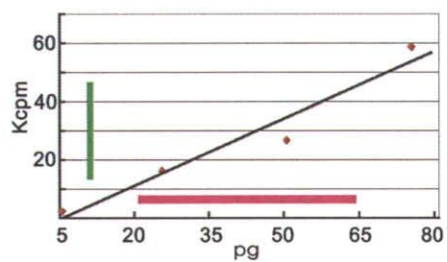


genesis, 33, 81-85(2002)

Calibration of mRNA/plasmid delivered



mRNA



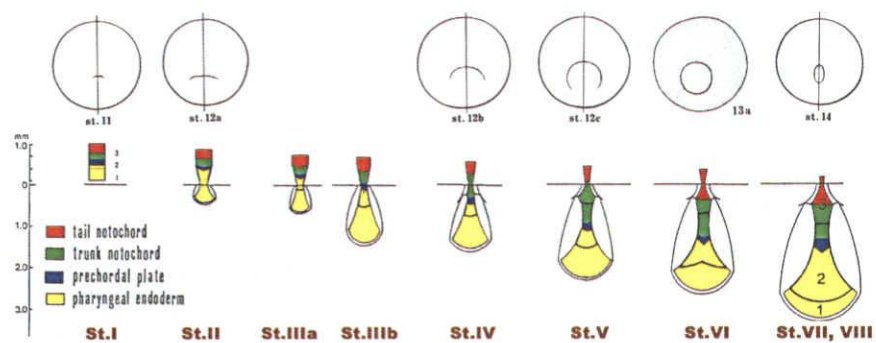
plasmid

イモリ胚遺伝子導入の目標

- 壊れやすいオーガナイザー領域へ導入
- じっくりと細胞系譜を追跡
- 形態的な変化を期待

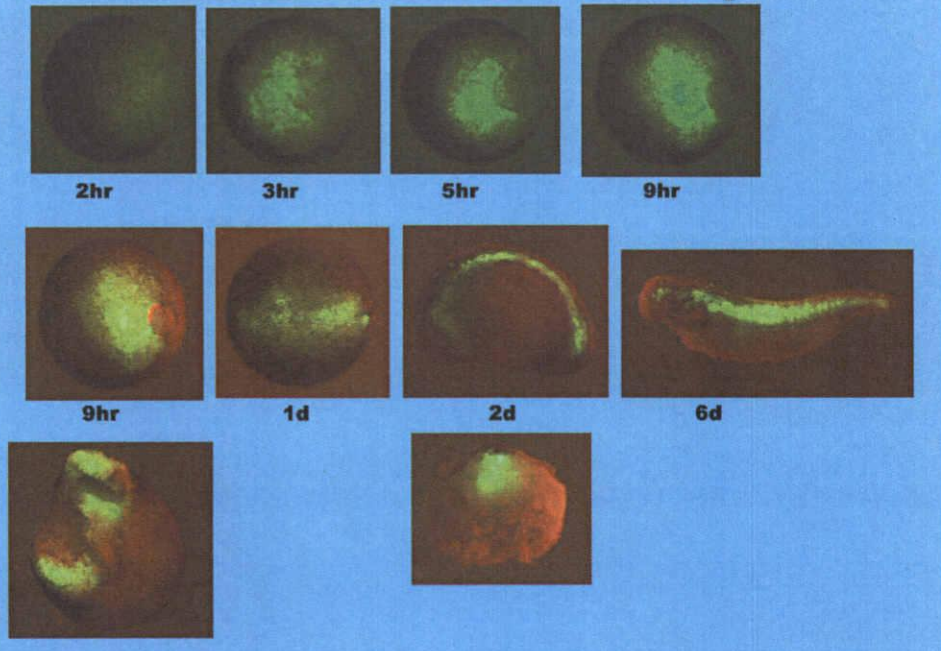


実験発生学のモデル「イモリ」の遺伝子レベルからの再検討

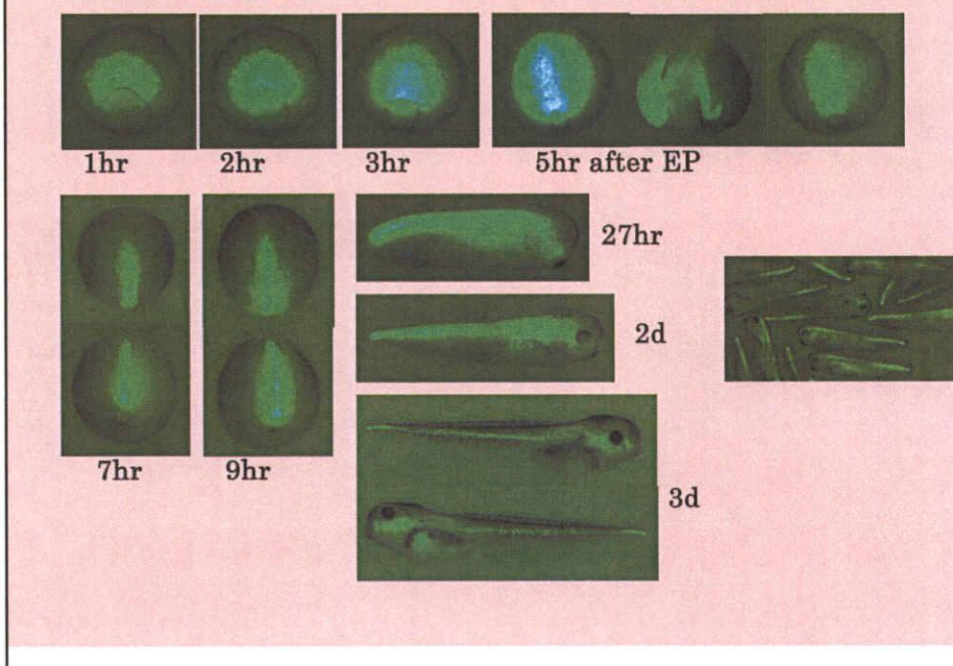


Hama et al.(1985)

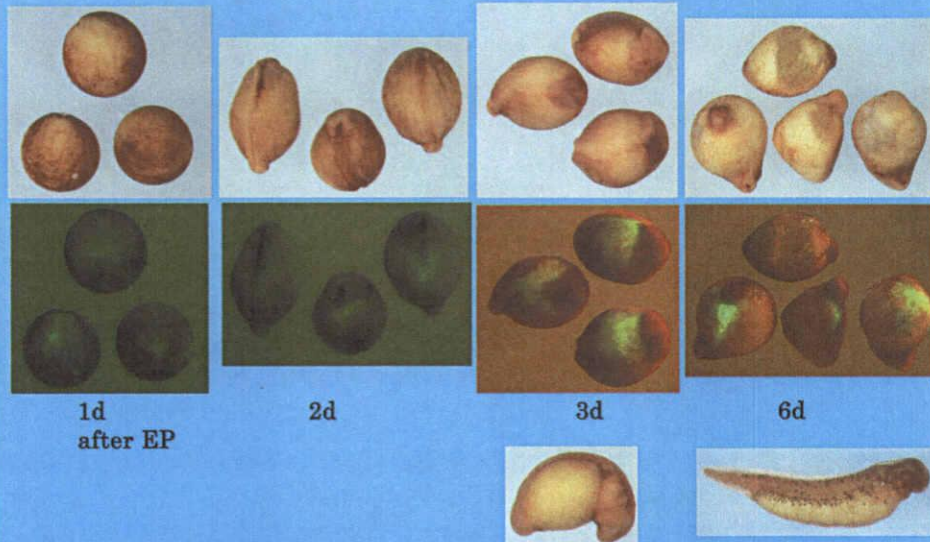
EP GFP-mRNA into the Dorsal Lip at st12a



EP GFP-mRNA into the Dorsal Lip :Xenopus



EP BMP4-mRNA into the Dorsal Lip at st12a



EP BMP4-mRNA into the Dorsal Lip

at st11+

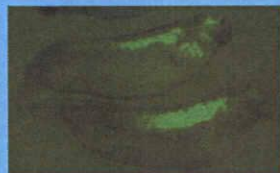


at st12a

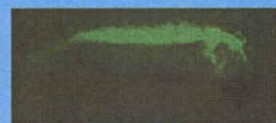


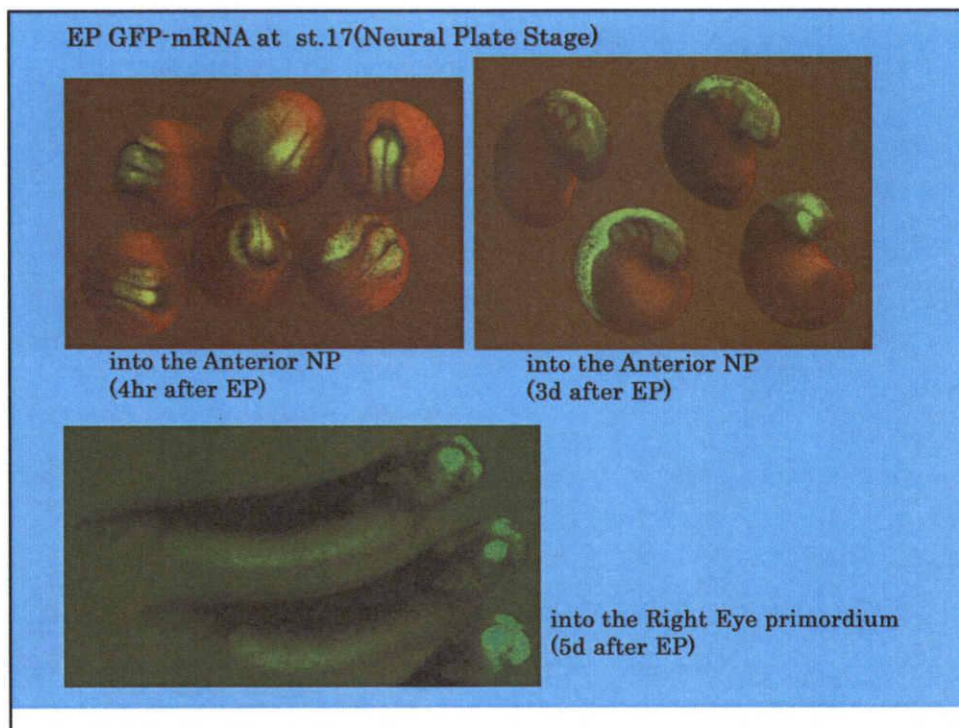
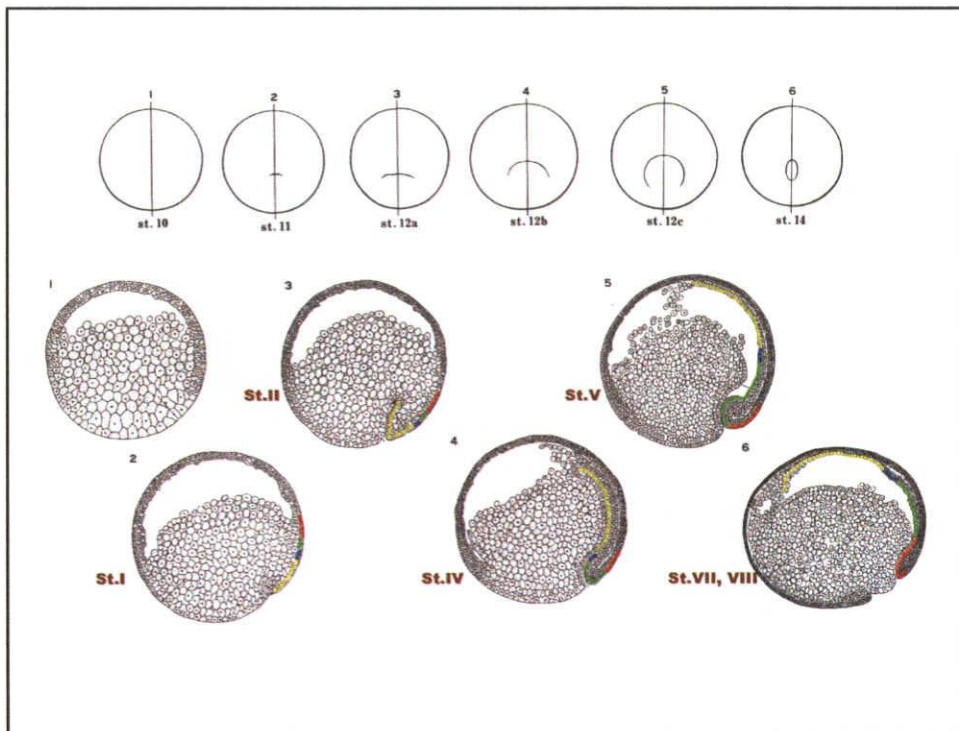
EP GFP-mRNA into the Dorsal Lip

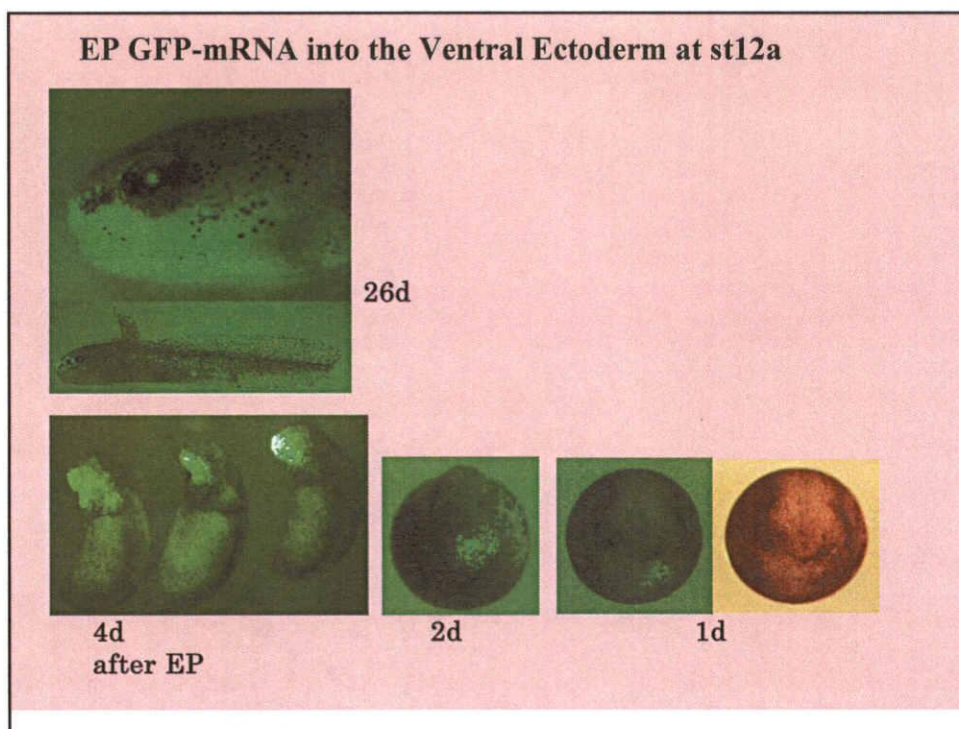
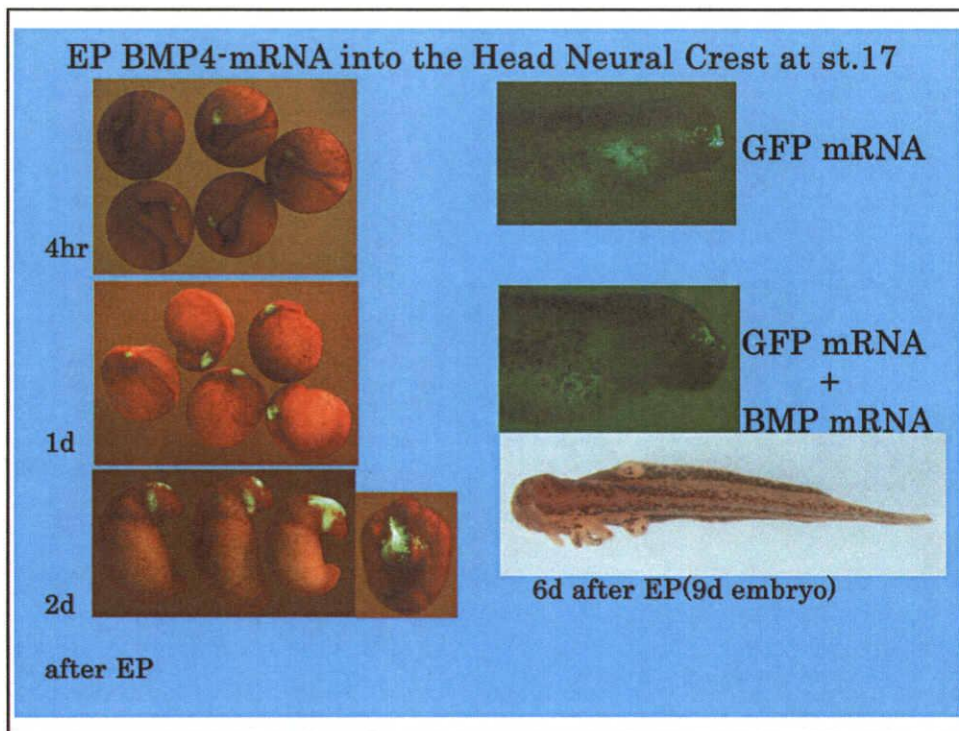
at st11+

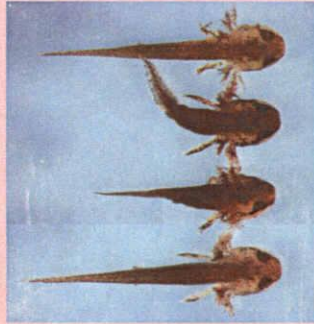


at st12a









pCMV-BMP disturbed the posterior morphogenesis
more effectively than BMP mRNA

イモリ胚遺伝子導入の課題

- ・ 領域・時期特異的なノックアウト
- ・ 種特異的な細胞系譜の検討
- ・ 形態/組織/マーカー遺伝子変化の解析



実験発生学のモデル「イモリ」の遺伝子レベルからの再検討

10th International Xenopus Meeting

**Marine Biology Laboratory
Woods Hole, Massachusetts, USA**

September 14th-18th 2004

Organizing Committee

Chris Wylie

Janet Heasman

Aaron Zorn

161. Gene delivery into the Spemann organizer by electroporation

Kazuhiro Takeshima

Radioisotope Research Center, Nagoya University, Nagoya, Japan

We have established the non-contact electroporation method for *Xenopus* embryos applied to the prospective eye region at the neural plate stage (Genesis 33, 81 - 85 and 86 - 96, 2002), and have expanded its application in various tissues and organs such as ear, gill, cement gland, muscle and limb bud. This technique can expand the gain- and loss-of-function approaches at specific regions or certain developmental stages of *Xenopus* embryos. It also makes enable to trace the cell lineage of a certain tissue and/or organ during *Xenopus* morphogenesis.

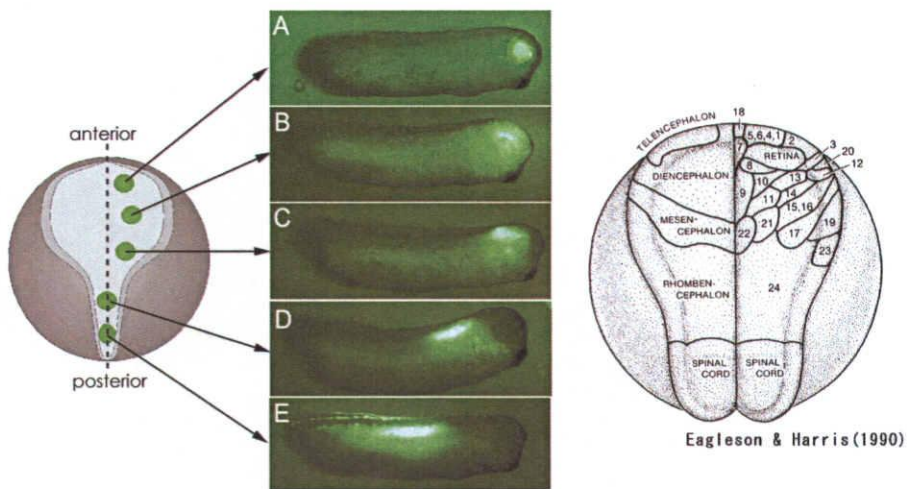
Here we focus on the gene delivery into the organizer region at the early gastrula stage (stage 10 - 10.5). As the cells around the dorsal blastopore lip are rather large and fragile, they are injured easily even with our mild non-contact electroporation. Some technical improvements including the filling up of vitellin space with mRNA or plasmid solutions led to the efficient gene transfer into the cells of Spemann organizer. The expression of GFP protein along with the axial mesoderm reached its peak within 0.5 - 1 day after electroporation. Delivery of pCMV-BMP4 plasmid at the *Xenopus* organizer region gave rise to double-tailed embryos. In the case of BMP4-mRNA, which is translated directly as the BMP4 protein, the malformation of head and the bulla formation at the trunk were observed. These differences between plasmid and mRNA might correspond to the disturbance of tail and head/trunk organizer, respectively, due to the time lag of their expression of BMP4 protein. In addition to the issues stated above, we present useful technical tips for electroporation of *Xenopus* embryos.

P
O
S
T
E
R
S

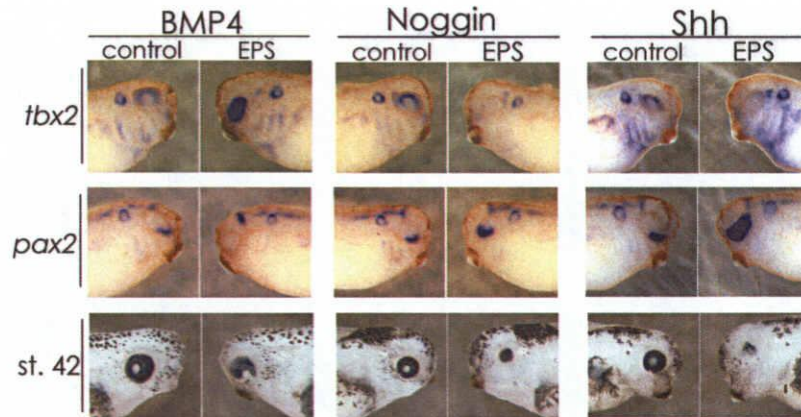
Gene Delivery into the Spemann Organizer by Electroporation

Kazuhito Takeshima
Nagoya University, Japan

Gene Delivery Aiming at the Primordia
on the Neural Plate(genesis, 33, 81-85, 2002)



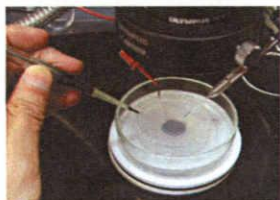
Electroporation at the Eye Primordium Disturbed its Fate^(genesis, 33, 86-96, 2002)



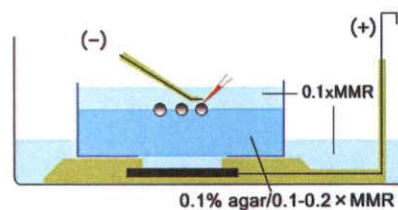
Standard Setup and Conditions



Electroporator
Microinjector
Dissecting
microscope



Non-contact
electrodes



Embryo: Remove jelly coat but not vitellin membrane

Microinjection:

Method 1: Inject 5-10 nl of solution intracellularly into a few upper epithelial layers

Method 2: Inject 200-300nl of solution under vitellin membrane

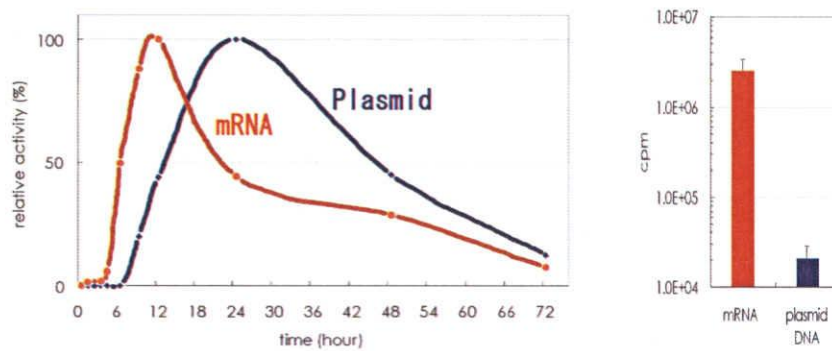
Electroporation:

Voltage: 19 - 25V

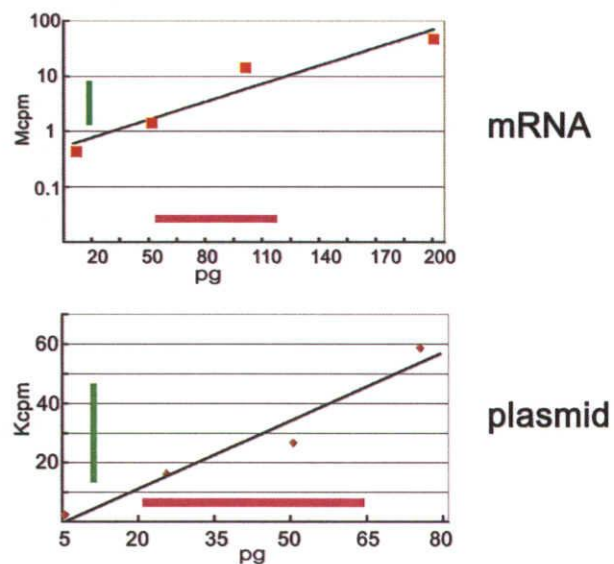
Pulse: 6-10 square wave pulses of 5msec with 95 msec interval

Resistance: 1.3 - 1.8 kΩ

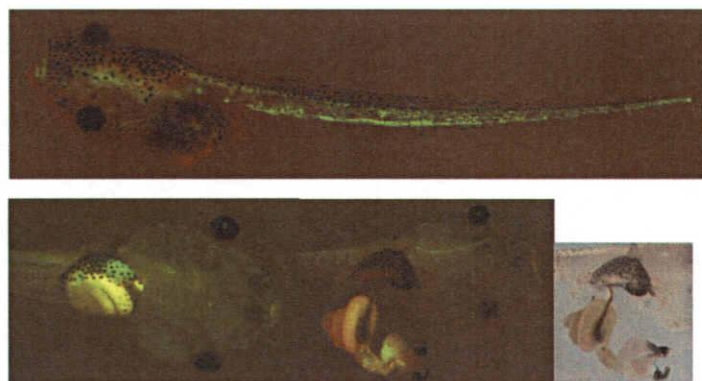
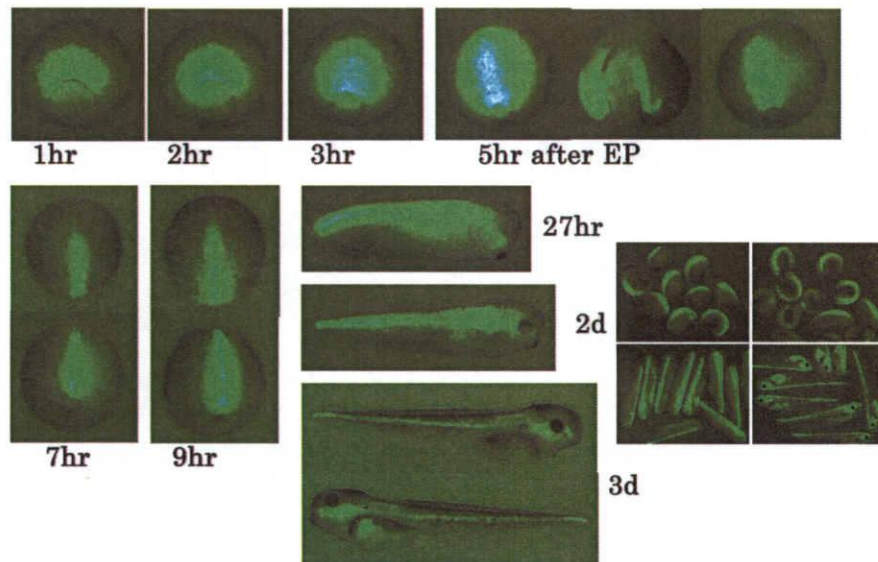
Expression Pattern and Efficiency of mRNA/plasmid Electroporated (genesis, 33, 81- 85, 2002)



Calibration of mRNA/plasmid Delivered

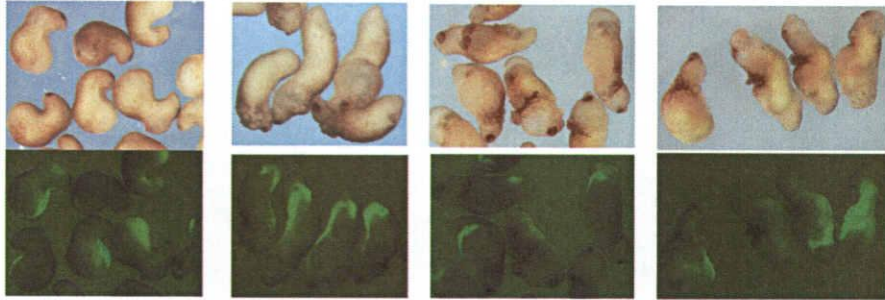


**Expression of GFP after Electroporation of GFP-mRNA
into the Dorsal Lip at st.10+**

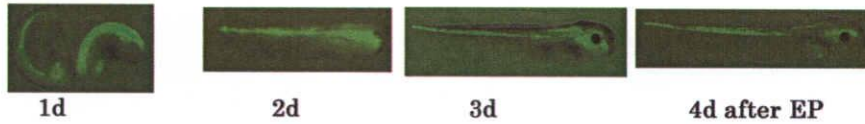


BMP4-mRNA Delivered into the Dorsal Lip Suppressed Head Formation

BMP4-mRNA + GFP-mRNA



GFP-mRNA



1d

2d

3d

4d after EP

pCMV-BMP4 Delivered into the Dorsal Lip Suppressed Tail Formation

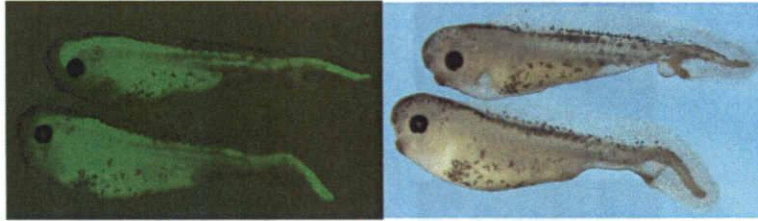


3d after EP

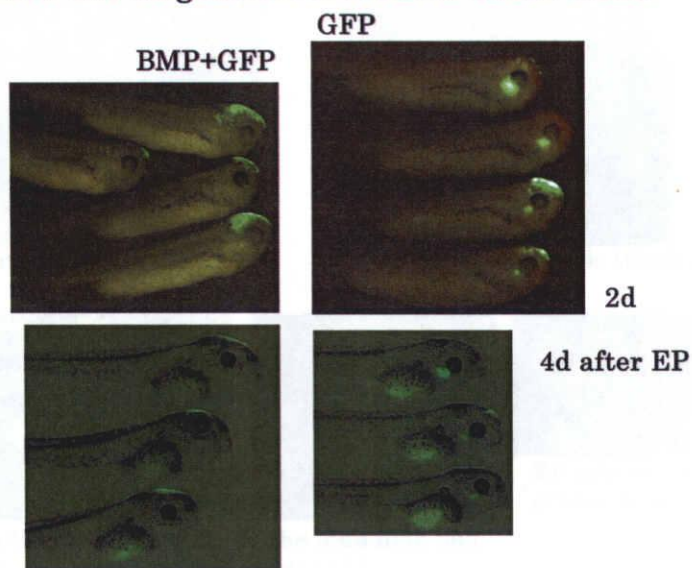


5d after EP

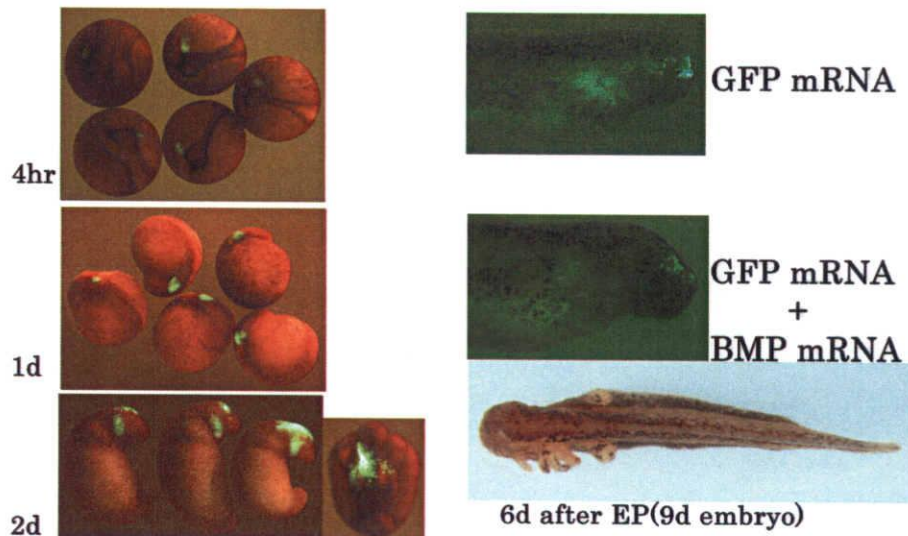
**Noggin-mRNA Delivered into the Dorsal Lip
Suppressed Tail Formation**



**BMP4-mRNA Electroporated into the Head Neural Fold
Inhibited the Migration of Neural Crest Cells**



In Japanese Newt, BMP4-mRNA Electroporated into the Head Neural Fold Inhibited the Formation of Gill



Gene Delivery into the Various Tissues and Organs

