テクニカルノート

刺胞動物ヒドラにおけるトランスジェニック研究

高 橋 俊 雄 (サントリー生有研)
takahashi@sunbor.or.jp

はじめに

トランスジェニック技術とは、生物に遺伝子 (DNA) や RNA などを導入する技術である。導入されるものはその生物に本来存在するものであったり、或いは、本来その生物には存在しないものであったりする。前者の場合、すでに存在する機能を亢進することができ (gain of function)、または、特定の機能を阻害 (loss of function) することができる。後者の場合は、新規の機能を付与 (addition of function) することができる。このような遺伝子を人為的に操作する技術は基礎科学のみならず応用科学の上でも必要不可欠なものとなっている。

1744年にトレンプラーにより初めて再生現象が見出されて以来¹⁾、淡水産の刺胞動物であるヒドラは再生のモデル動物として長く研究材料として用いられてきた。しかしながら、再生現象という形態形成のメカニズムを研究する上で大変興味深い動物であるにもかかわらず、遺伝学的解析に優れた性質を持つショウジョウバエ、マウス、ゼブラフィッシュ、線虫のようなモデル動物に比べ、ヒドラはトランスジェニック技術を駆使した発生遺伝学の分野で大きな遅れをとることとなった。

2006年に、マイクロインジェクション法を用いてのオワンクラゲの緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) の導入により“光るヒドラ”が報告され²⁾、発生遺伝学の分野においても一躍脚光を浴びるようになった。この報告がきっかけとなり、今日までに蓄積された形態形成の成果を、生きたヒドラで実証することが可能となった。さらに、ヒドラは動物界で最も単純な神経系である散

在神経系を有することから、神経ペプチドやペプチドホルモンをコードしている前駆体遺伝子の導入も試みられている。

本稿では、マイクロインジェクション法によるヒドラの受精卵への遺伝子導入技術、エレクトロポレーション法による2本鎖 RNA を誘導し標的遺伝子の機能を抑制する技術 (RNAi)、そして、作出されたトランスジェニックヒドラを利用した研究成果を紹介する。

ヒドラの精子・卵子形成

トランスジェニックヒドラを作出する場合、得られる卵あるいは精子の量、受精率、孵化率などが重要となる。

ヒドラは雌雄異体で、外見上からは雌雄の区別はできず、環境状態が悪化 (水質、飼育温度など) するとオスヒドラからは精子が、メスヒドラからは卵子が形成される。そのため、判別後は、オスヒドラとメスヒドラを分けて飼育する必要がある。ヒドラの野生系統に AEP 系統があり、このヒドラはオスとメスを区別し、実験用として長年飼育されている³⁾。このヒドラを大量培養し、以下に示す手順で有性化を誘導することにより、多くの精子、卵を供給することが可能となった。(1) 3週間、毎日エサ (アルテミア) を与える。(2) その後、エサを与えず、5日間飢餓状態にする。(3) そして、1週間に2回、エサを与えてヒドラを維持する。

このようにして得られた精子、卵を掛け合わせ、顕微鏡下で卵割を目安にして受精を観察する。この系統を利用することにより、短期間に有性化を行い、ほぼ100%の受精率が得られるため、トランスジェニック系統を作

成するのに大変都合がよい。

遺伝子導入法

これまでにヒドラで行われてきた遺伝子導入法には以下の2種類がある。

1) マイクロインジェクション法

受精卵に直接目的遺伝子を含む発現ベクターを注入する方法で、比較的成本が安く、確実にベクターを導入することができる。しかしながら、顕微鏡下で微小な受精卵(図1A)に1粒ずつ処理するために、高度な技術が必要となる。また、処理可能な数が制限される。

ヒドラ胚発生の特徴として、受精から48時間後に、受精卵は硬質の膜に覆われる(図1B)。この膜に覆われることにより、乾燥に耐える特徴を持つが、いつ孵化するかは個々の受精卵によって変動がある。通常、30日程度で孵化してくるが(図1C)、1年経っても孵化しない受精卵もある。遺伝子導入の成功率としては、孵化しない受精卵を含めて20%前後である。

2) エレクトロポレーション法

電気的パルスにより一過的に細胞の膜を破断する装置を用いて、発現ベクターや2本鎖RNAを取り込ませるものである。ヒドラでは、発現ベクターを導入した成功例はないが、2本鎖RNAの導入は数種の遺伝子で成功し、その機能を阻害した結果が報告されている^{4~7)}。エレクトロポレーション法を用いて、ヒドラに2本鎖RNAを導入する方法として、(1)体全体に2本鎖RNAを導入する方

図1 マイクロインジェクション法による発現用ベクターの導入

法^{4,5)}と、(2)ヒドラの生物学的特徴を生かして局所的に(出芽体に)2本鎖RNAを導入する方法の2つがある^{6,7)}。(1)の方法は、ヒドラの体全体に、無作為に2本鎖RNAを導入するため、その機能阻害の割合は低い。一方、(2)の方法では、出芽体にのみ2本鎖RNAを導入するため、ヒドラにダメージを与えず、また機能阻害の割合も高い。次に筆者らが行った局所的エレクトロポレーション法を用いた機能阻害実験(RNAi実験)の一例を示す。

筆者らは、ヒドラの頭部形成、特に触手形成に関わるペプチドHym-301(KPPRRCYLN GYCSPamide)を同定している⁷⁾。Hym-301遺伝子は出芽体ができ始めるとすぐに外胚葉上皮で発現を始め、出芽体の伸長とともに将来の頭部領域のみで発現する。そこで、出芽体の将来頭部になる領域にエレクトロポレーション法を用いて2本鎖RNAを導入し(図2A)、Hym-301遺伝子発現を阻害すると、部分的ではあるが触手形成が抑制された。また、遺伝子発現においても一過的な抑制が認められた(図2B、C)。エレクトロポレーション法では、特定の機能を一過的に阻害することはできるが、半永久的な阻害は不可能なのが欠点である。

ヒドラ用発現ベクターの構築

実用的なトランスジェニック用発現ベクターを得る目的で、ヒドラで強力なプロモーター活性を有するアクチン遺伝子プロモーターがクローニングされ、その下流にGFPをつなげたベクターが構築された²⁾。その後、このベクターをもとに改良された発現ベクターが利用されている(図3)。

図2 局所的エレクトロポレーション法による2本鎖RNAの導入

図3 ヒドラ用発現ベクター

マイクロインジェクション法による遺伝子導入

ヒドラにおけるマイクロインジェクションの条件としては、(1) 2～8細胞期の受精卵に一回、発現ベクターの導入を行う。(2) 発現ベクターは、0.6μg/ul (0.1μl) を導入する。(3) 導入後はヒドラの飼育水の中で、18℃で飼育する。以上によって、一日に得た受精卵の中から、1つの導入用発現ベクターに20～30個の受精卵を使用する。導入した受精卵の孵化までの生存率は約55%であり、実験室レベルで十分に飼育可能な“子ヒドラ”を得ることができる(図1C)。しかしながら、何匹かの子ヒドラはGFPの発現が一過的で、10日程でその発現が消失するものもある。GFPを安定に発現しているヒドラについては、出芽による無性生殖により増殖、大量培養し、クローン化する。

これまでに、ヒドラの多能性幹細胞およびその分化産物(神経細胞、刺細胞、分泌細胞そして生殖細胞)にGFPが特異的に発現しているもの⁸⁾、ヒドラの体の部域特異的にGFPを発現しているもの⁹⁾、を作出している。

今後の展望

実用的なトランスジェニックヒドラシステムの作出が確立され、ヒドラを用いた遺伝学的解析が可能となった。刺胞動物は、前口、後口動物の分岐以前に生じた原始的な多細胞動物

で、神経系を持ち始める最初の動物でもある。従って、高等動物で機能する基本的な分子群や機構は刺胞動物に備わっていると考えられる。筆者らは、ヒドラの神経ペプチドやペプチドホルモンをコードしている前駆体遺伝子を導入した系統や、それらリガンドに対する受容体遺伝子を導入した系統を作成中である。特に上記のアクチンプロモーターを用いた強発現系、変異を導入したドミナントネガティブ系統を作成することにより、リガンドとその受容体の生体内機能を同時に明らかにすることができる。上記のアクチンプロモーターを標的遺伝子のプロモーター領域に組換えることにより、in vivoでのプロモーター解析も可能である。

ヒドラの神経細胞には寿命があり、常に多能性幹細胞から新たに分化した神経細胞と置き換わっている。従って、ヒドラには神経細胞の集団を常に一定に保つ機構(ホメオスタシス)が存在する。筆者らは多能性幹細胞から神経細胞への分化を正に制御する神経ペプチドHym-355¹⁰⁾、負に制御する上皮由来のPWペプチド族を同定している¹¹⁾。このことは、多能性幹細胞—上皮細胞—神経細胞間の細胞間コミュニケーションが存在し、これらのペプチドの拮抗的作用により、ヒドラの神経集団は一定に保持されていると考えられる。ヒドラの多能性幹細胞系列のトランスジェニック系統の作出により⁸⁾、ヒドラの出芽や再生などのダイナミックな形態形成において、これら三者の細胞動態をin vivoで観察することが可能となった。また、この系統をアッセイ系として、細胞分化に関与する新たなシグナル分子の探索にも活用できることが期待される。ヒドラから得られる成果により、多能性幹細胞の増殖・分化機構の分子基盤が確立することができるので、高等動物の成体幹細胞や再生の研究では解明できない多細胞動物全体で保存されている再生機構や組織形成の一般原理を提唱するに至ることが期待できる。また、ヒドラで確立されたトランスジェニック技術は、同じ刺胞動物門に属するク

ラゲやサンゴ、イソギンチャクにも応用可能であると予想される。

文 献

- 1) Trembley A (1744) Memoires, Pour Servir a l'Histoire d'un Genre de Polypes d'Eau Douce, a Bras en Forme de Cornes (Verbeek, Leiden, The Netherlands).
- 2) Wittlieb J, Khalturin K, Lohmann JU, Anton-Erxleben F & Bosch TCG (2006) Transgenic *Hydra* allow in vivo tracking of individual stem cells during morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 6208-6211.
- 3) Martin VJ, Littlefield CL, Archer WE & Bode HR (1997) Embryogenesis in *Hydra*. *Biol Bull*, **192**, 345-363.
- 4) Lohmann JU, Endl I & Bosch TCG (1999) Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Dev Biol*, **214**, 211-214.
- 5) Lohmann JU & Bosch TCG (2000) The novel peptide HEADY specifies apical fate in a simple radially symmetric metazoan. *Genes Dev*, **14**, 2771-2777.
- 6) Smith KM, Gee L & Bode HR (2000) HyAlx, an aristaless-related gene, is involved in tentacle formation in *hydra*. *Development*, **127**, 4743-4752.
- 7) Takahashi T, Hatta M, Yum S, Gee L, Ohtani M, Fujisawa T & Bode HR (2005) Hym-301, a novel peptide, regulates the number of tentacles formed in *hydra*. *Development*, **132**, 2225-2234.
- 8) Khalturin K, Anton-Erxleben F, Milde S, Plotz C Wittlieb J, Hemmrich G & Bosch TCG (2007) Transgenic stem cells in *Hydra* reveal an early evolutionary origin for key elements controlling self-renewal and differentiation. *Dev Biol*, **309**, 32-44.
- 9) Khalturin K, Anton-Erxleben F, Sassmann S, Wittlieb J, Hemmrich G & Bosch TCG (2008) A novel gene family controls species-specific morphological traits in *Hydra*. *PLOS Biol*, **6**, 2436-2449.
- 10) Takahashi T, Koizumi O, Ariura Y, Romanovitch A, Bosch TCG, Kobayakawa Y, Mohri S, Bode HR, Yum S, Hatta M & Fujisawa T (2000) A novel neuropeptide, Hym-355, positively regulates neuron differentiation in *Hydra*. *Development*, **127**, 997-1005.
- 11) Takahashi T, Koizumi O, Hayakawa E, Minobe S, Suetsugu R, Kobayakawa Y, Bosch TCG, David CN & Fujisawa T (2000) Further characterization of the PW peptide family that inhibits neuron differentiation in *Hydra*. *Dev. Genes Evol.* (In press)