

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001 - 136962

(P 2 0 0 1 - 1 3 6 9 6 2 A)

(43)公開日 平成13年 5月22日 (2001.5.22)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C12N 15/01		A01H 1/00	A 2B030
A01H 1/00		C12N 13/00	4B033
C12N 13/00		15/00	E

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 4 頁)

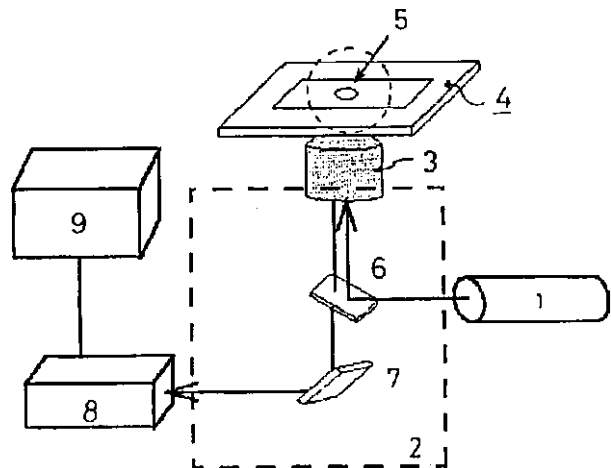
(21)出願番号	特願平11 - 322481	(71)出願人	396020800 科学技術振興事業団 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
(22)出願日	平成11年11月12日(1999.11.12)	(72)発明者	弓場 俊輔 大阪府吹田市山田丘 1 - 3 大阪大学細胞 生体工学センター内
		(72)発明者	船津 高志 東京都新宿区大久保 3 - 4 - 1 早稲田大 学理工学部内
		(74)代理人	100093230 弁理士 西澤 利夫
		F タ-ム(参考)	2B030 CA15 CA17 CA19 4B033 NG05 NH02 NH10 NJ04 NK10

(54) 【発明の名称】局所的遺伝子発現調節法

(57) 【要約】

【課題】 任意の局所領域に遺伝子発現を起こさせる方法を提供する。

【解決手段】 赤外線レーザーを、生物個体の単一細胞、組織などの局所領域に選択的に照射し、生物個体の局所領域の温度を上昇させることにより、熱ショックによる部位特異的遺伝子組換えを引き起こさせる



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 赤外線レーザーを、生物個体の局所領域に選択的に照射し、生物個体の局所領域の温度を上昇させることにより、熱ショックによる部位特異的遺伝子組換えを引き起こさせることを特徴とする局所的遺伝子発現調節法。

【請求項 2】 赤外線レーザーを照射する生物個体が、熱誘導ベクターを外来遺伝子として体内に有する個体であり、該熱誘導ベクターが、構成的プロモーターの下流に組換え標的配列、転写抑制カセット、熱ショックプロモーター、部位特異的組換え酵素遺伝子、組換え標的配列が順に存在しており、最下流に発現させようとする遺伝子が存在する構造であることを特徴とする請求項 1 の局所的遺伝子発現調節法。

【請求項 3】 赤外線レーザーの局所的照射が、少なくとも赤外線レーザー、顕微鏡、および対象生物個体を装着する生物試料台からなる赤外線レーザー顕微鏡システムを用いて行われることを特徴とする請求項 1 または 2 の局所的遺伝子発現調節法。

【請求項 4】 局所的遺伝子発現法において、生物個体に導入される熱誘導ベクターで、構成的プロモーターの下流に組換え標的配列、転写抑制カセット、熱ショックプロモーター、部位特異的組換え酵素遺伝子、組換え標的配列が順に存在しており、最下流に発現させようとする遺伝子が存在する構造を有することを特徴とする熱誘導ベクター。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は、生物個体に部位特異的に遺伝子組換えを引き起こさせる遺伝子工学的的手法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、生物個体の局所領域に赤外線レーザーを照射することにより部位特異的遺伝子組換えを引き起こさせる遺伝子工学的的手法に関するものである。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術とその課題】固体の発生において、最も簡単に標的細胞の変化を引き起こす方法としては、従来よりレーザー光を用いたレーザーアブレーション法が知られている。この方法は、色素レーザーを照射することにより、ラジカルを発生させ、標的細胞を死滅させる方法で、特定の細胞を死滅させることによって個体の発生、分化に変化を起こす。しかし、この方法では、細胞を生かしたままの状態では遺伝子発現を調節することができないという点が大きな問題となっている。

【 0 0 0 3 】同様の手法として、紫外光のパルスレーザーを細胞に照射して遺伝子発現に変調を加える方法も知られている。しかし、この方法では、強力な紫外光を照射するため、やはり細胞の損傷が避けられないことが問題となっている。

【 0 0 0 4 】従来より、医学、農学を始めとする分野に

おいて、生物個体に部位特異的遺伝子組換えを引き起こさせることが行われており、そのための様々な遺伝子工学的的手法が開発されている。

【 0 0 0 5 】部位特異的遺伝子組換えを行う方法としては、部位特異的遺伝子組換え酵素 Cre と組換え標的配列を含むベクターを用いる遺伝子工学的的手法が知られている。これらの方法では、目的とする遺伝子と構成的プロモーターを、組換え標的配列で挟まれた転写抑制カセットによって隔離しておき、部位特異的遺伝子組換え酵素遺伝子の作用によって、二つの組換え標的配列によって挟まれた転写抑制カセットが組換えられ、除かれる。そして、これによりプロモーターが目的遺伝子の転写を始める。部位特異的組換え酵素遺伝子は、何らかの発現誘導があった場合のみ活性化されるので、二つの組換え標的配列に挟まれた部位が除去されるためには、任意組織で部位特異的組換え酵素遺伝子のような特定遺伝子の発現を限定するプロモーターが必要である。しかし、あらゆる細胞や組織についてこのような特定部位で作用するプロモーターを得ることはほとんど不可能であり、任意の局所領域における特異的遺伝子組換えは、事実上不可能であった。

【 0 0 0 6 】そこで、この出願の発明は、以上の通りの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、任意の局所領域において遺伝子発現を起こさせる方法を提供することをその課題としている。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、まず第 1 に、赤外線レーザーを、生物個体の単一細胞、組織などの局所領域に選択的に照射し、生物個体の局所領域の温度を上昇させることにより、熱ショックによる部位特異的遺伝子組換えを引き起こさせることを特徴とする局所的遺伝子発現調節法を提供する。

【 0 0 0 8 】また、この出願の発明は、第 2 には、上記の局所的遺伝子発現調節法において、赤外線レーザーを照射する生物個体が、熱誘導ベクターを外来遺伝子として体内に有する個体であり、該熱誘導ベクターが、構成的プロモーターの下流に組換え標的配列、転写抑制カセット、熱ショックプロモーター、部位特異的組換え酵素遺伝子、組換え標的配列が順に存在しており、最下流に発現させようとする遺伝子が存在する構造であることをもその態様として提供する。

【 0 0 0 9 】さらに、この出願の発明は、第 3 には、上記の局所的遺伝子発現調節法において、赤外線レーザーの局所的照射が、少なくとも赤外線レーザー、顕微鏡、および対象生物個体を装着する生物試料台からなる赤外線レーザー顕微鏡システムを用いて行われることをもその態様として提供する。

【 0 0 1 0 】そして、この出願の発明は、第 4 には、この局所的遺伝子発現調節法において、生物個体に外来遺

伝子として導入する熱誘導ベクターで、構成的プロモーターの下流に組換え標的配列、転写抑制カセット、熱ショックプロモーター、部位特異的組換え酵素遺伝子、組換え標的配列が順に存在しており、最下流に発現させようとする遺伝子が存在する構造を有することを特徴とする熱誘導ベクターを提供する。

【 0 0 1 1 】

【発明の実施の形態】以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。

【 0 0 1 2 】この出願の発明の局所的遺伝子発現調節法は、赤外線レーザーを、生物個体の単一細胞、組織などの局所領域に選択的に照射し、生物個体の局所領域の温度を上昇させることにより、熱ショックによる部位特異的遺伝子組換えを引き起こさせるものである。

【 0 0 1 3 】このとき照射される対象となる生物個体は、外来遺伝子として特定の構造を有する熱誘導ベクターを持っていることが好ましく、その熱誘導ベクターとして、この出願の発明は、構成的プロモーターの下流に組換え標的配列、転写抑制カセット、熱ショックプロモーター、部位特異的組換え酵素遺伝子、組換え標的配列が順に存在しており、最下流に発現させようとする遺伝子（以下 Gene X とする）が存在する構造である熱誘導ベクターを提供する。

【 0 0 1 4 】そして、照射される対象となる生物個体は、以上の熱誘導ベクターを外来遺伝子として有するトランスジェニック生物であることが好ましい。この出願の発明の熱誘導ベクターでは、構成的プロモーターの下流に、部位特異的組換え酵素遺伝子の遺伝子を繋いだ発現カセットが存在する。部位特異的組換え酵素は、組換え配列を認識して、そこで組換えを起こす。しかしこのベクターでは、さらに発現カセットの 5' 側に、上流の構成的プロモーターによる転写を止める目的と熱ショックプロモーターによる漏出發現を防止する目的で転写抑制カセットが導入されている。そのため、通常の状態では、転写は進行せず、転写抑制カセットによって阻害されてしまう。

【 0 0 1 5 】しかし、熱ショックにより部位特異的組換え酵素の発現誘導がかかれば、組換えにより、組換え標的配列で挟まれた二つのカセット（転写抑制カセットと発現カセット）と一緒に除かれ、初めて構成的プロモーターと Gene X が直結し、以降、このプロモーターによって Gene X が永続的に発現する。

【 0 0 1 6 】このような熱誘導ベクターを有するトランスジェニック生物は、温浴などの通常の方法で加熱すれば、あらゆる部位において、Gene X の発現が誘導されてしまうため、部位特異的遺伝子組換えを起こすためには、生物個体を局所的に加熱する方法が必要である。

【 0 0 1 7 】そこで、局所的に生物個体を加熱する方法として、この出願の発明では、赤外線レーザーを対物レ

ズにより、標的とする箇所に集光させる方法を用いる。エネルギーの比較的低い赤外線レーザーを使用し、さらにレーザーを集光させることにより標的を限定することが可能となり、非侵襲的に上記のトランスジェニック生物において遺伝子発現を自在に調節することができるようになる。ここで、標的とは生物個体の単一細胞であってもよいし、複数の細胞からなる組織であってもよい。

【 0 0 1 8 】赤外線レーザー顕微鏡システムとしては、共焦点蛍光顕微鏡をベースとし、赤外線レーザー発信装置を組み込むことにより構築する。顕微鏡に赤外線レーザーが導入されることによって、標的細胞に赤外線レーザー光を集光することが可能となる。

【 0 0 1 9 】カバーガラスから数百マイクロメートル離れた特定の細胞の核だけを加熱し、周囲を暖めないようにするためには、レーザーの波長と集光法に細心の注意を払う必要がある。標的細胞に到達するまでレーザーが吸収されず、しかも標的細胞を十分に加熱するためには、1 3 0 0 ~ 3 0 0 0 nm の波長のレーザーを用い、高開口数の対物レンズを用いることが好ましい。この条件では、細胞の温度を 1 0 上昇させるのに必要なレーザー光の強度は集光領域で ~ 1 0 0 mW となり、数ワットの出力をもつ半導体レーザーで十分対応できる。

【 0 0 2 0 】以下実施例を示す。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

【 0 0 2 1 】

【実施例】図 1 は、この出願の発明に用いる赤外線レーザーを照射するための赤外線レーザー顕微鏡システムの概略説明図である。

【 0 0 2 2 】また、図 2 はトランスジェニック生物に赤外線レーザーを照射、集光させる方法を模式的に表わした概略説明図である。

実施例 1

熱誘導ベクターとして、Elongation Factor 1 (EF1) プロモーター / loxP - 転写抑制 - [熱ショックプロモーター - Cre] - loxP / Cyan Fluorescent Protein 遺伝子を外来遺伝子として有するトランスジェニックゼブラフィッシュを通常の遺伝子工学的手法により樹立した。

【 0 0 2 3 】図 1 に示すように、ラマンレーザー（波長 1 4 8 0 nm）を赤外線レーザー顕微鏡システムによってこのトランスジェニックゼブラフィッシュの胚に集光させ、生物個体上の標的部位（単一細胞）を加熱した。Cre の発現が誘導され、部位特異的遺伝子組換えにより、Cyan Fluorescent Protein 遺伝子の発現が認められた。

【 0 0 2 4 】

【発明の効果】以上詳しく説明した通り、この発明によって、生物個体を局所的に加熱し、部位特異的に遺伝子

組換えを引き起こすことのできる、任意の局所領域における遺伝子発現調節法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】この出願の発明である局所的遺伝子発現調節法を実施するために用いる赤外線レーザー顕微鏡システムを例示した概略説明図である。

【図2】この出願の発明の実施例であり、生物個体（トランスジェニックゼブラフィッシュの胚）に赤外線レーザーを集光する方法を模式的に示した概略説明図である。

【符号の説明】

1 赤外線レーザー発信機

1 a 赤外線レーザー光

2 顕微鏡

3 対物レンズ

4 試料台

5 生物試料

5 a 細胞

6 ダイクロイックミラー

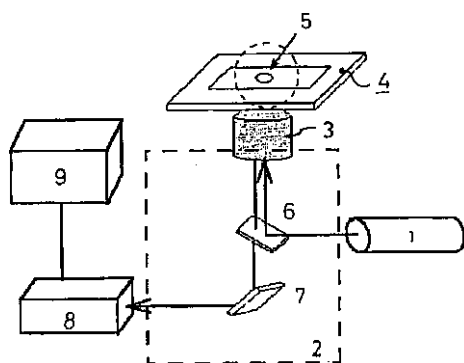
7 ミラー

8 共焦点ユニット

9 画像解析装置

10 10 生物個体（トランスジェニックゼブラフィッシュの胚）

【図1】



【図2】

