

小型魚類変異体に基づく脊椎動物遺伝子の網羅的機能比較解析

●川上 浩一

国立遺伝学研究所個体遺伝研究系初期発生研究部門

<研究の目的と進め方>

哺乳動物から魚類にいたるまで複数の脊椎動物ゲノムの塩基配列が解読されてきた。しかしながら、これらゲノム上の未知遺伝子の機能、あるいはノンコーディング領域の未知の機能が直ちに明らかになるわけではない。

ゼブラフィッシュは、(1) 繁殖及び多数の個体の飼育が容易である、(2) 体外受精し胚が透明であるため発生過程の観察・操作が容易である、(3) 世代時間が短い(2~3ヶ月)、等の特長をもつため、脊椎動物の高次生命現象を遺伝学的に解析するためのモデル生物として優れている。

我々は、ゼブラフィッシュにおいて網羅的にゲノム機能を解析することができる、トランスポゾンを用いた遺伝子トラップ法及びエンハンサートラップ法を開発してきた。この方法では、To12トランスポゾンに基に構築した遺伝子トラップコンストラクトおよびエンハンサートラップコンストラクトをゼブラフィッシュゲノムにランダムに挿入させ、トランスポゾン上のGFP遺伝子を挿入部位近傍の遺伝子からの転写の流入、あるいは挿入部位近傍に存在するエンハンサー活性により活性化させ発現させる。すなわちこの方法では、GFPを細胞特異的・器官特異的に発現するゼブラフィッシュを作製することができる。そのようなゼブラフィッシュを解析することにより、発生過程において組織・細胞・器官特異的に発現する遺伝子およびエンハンサーを同定することができる。また、これらトラップコンストラクトの挿入は、挿入された遺伝子の活性を阻害する。すなわち、トラップコンストラクト挿入のホモ2倍体を作製し解析することにより、その遺伝子の機能を明らかにすることができる。

本研究では、ゼブラフィッシュを用いた遺伝子トラップ法及びエンハンサートラップ法を実施する。これによりゼブラフィッシュゲノムおよび遺伝子の構造、発現、機能についての知見を得る。これらをデータベース化し、他の脊椎動物のゲノムおよび遺伝子の構造、発現、機能と比較するための基盤を構築する。

<2008年度の研究の当初計画>

- (1) 転移酵素mRNAと遺伝子トラップあるいはエンハンサートラップトランスポゾンコンストラクトをもつプラスミドDNAをゼブラフィッシュ受精卵に注入する。これらをかけあわせて得たF1胚を蛍光顕微鏡で観察する。これらの解析によって、初期発生過程において、GFPあるいは酵母転写因子Gal4を細胞・組織・器官特異的に発現するトランスジェニックフィッシュを作製する。
- (2) 細胞・組織・器官特異的にGFPを発現する遺伝子トラップ・エンハンサートラップゼブラフィッシュについてサザン解析とさらなるかけあわせを行い、単一トランスポゾン挿入をもつゼブラフィッシュを系統として樹立する。本年

度新たに50系統樹立することを目標とする。これらの系統を基にして国内外の研究者と積極的に共同研究を行う。

- (3) 遺伝子トラップ・エンハンサートラップゼブラフィッシュがもつトランスポゾンの挿入部位を決定し、染色体上にマップする。またその近傍のゲノム解析を行い、細胞・組織・器官特異的に発現する遺伝子を同定する。これらにより、遺伝子の構造と発現情報を取得する。
- (4) トランスポゾン挿入ヘテロ2倍体のオスメスをかけあわせ、ホモ2倍体胚を作製し、表現型を解析する。これによりトランスポゾン挿入により破壊された遺伝子の機能情報を取得する。
- (5) 以上の解析から得られたゼブラフィッシュ遺伝子の発現・構造・機能情報を支援班の支援によって整備してきたデータベースzTrapに組み込み、公開していく。

<2008年度の成果>

- (1) 我々はゼブラフィッシュを用いて遺伝子トラップスクリーニングを行い、劣性の母性効果変異misty somiteを同定した。その変異の原因遺伝子のクローニングを行い解析した。misty somite遺伝子の機能阻害胚においては、体節境界が形成されるが維持されない。また体節の細胞の極性に異常が生じていた。このようにゼブラフィッシュ misty somiteは体節境界維持に必須新規遺伝子である。
- (2) Gal4-UASシステムによって特異的な細胞・組織で遺伝子発現させる方法は、有力な遺伝学的方法論としてショウジョウバエでさかんに用いられてきた。今回、我々はTo12トランスポゾンを用いることにより、この方法をモデル脊椎動物ゼブラフィッシュに適用することに成功した。さらに破傷風毒素遺伝子をUASの下流に組み込んだトランスジェニックフィッシュを作製し、神経機能の阻害に成功した。
- (3) 我々は、ゼブラフィッシュにおいて有効にCre-loxPシステムを利用するために、Creの組換え反応によって緑色(GFP)から赤色(RFP)に蛍光色を変化させるトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した。
- (4) 我々は、ニワトリの網膜神経の投射を視覚化する方法を開発した。To12トランスポゾンを用いてGFPをニワトリ胚ゲノムへ組み込む際、様々なサイズの電極を用いることで網膜全体あるいは局所的な神経の投射を観察することができた。
- (5) 我々は、脊椎動物トランスポゾンTo12がショウジョウバエで転移することを発見し、GFPあるいは網膜色素京成遺伝子whiteのトランスジェニックショウジョウバエを作製した。
- (6) 我々は、熱ショックプロモーターの下流にTo12転移酵素の

cDNAを組み込んだトランスジェニックフィッシュを作製した。このトランスジェニックフィッシュのゲノム上に単一コピーのTol2挿入を導入し、オスの成魚に熱ショック処理を施した。その結果、単一コピーのTol2が生殖細胞において効率よく転移することを見いだした。この方法はゼブラフィッシュゲノムにトランスポゾン挿入を多数、効率よく作製するのに役立つ。

- (7) 我々は、H-RAS癌遺伝子のconstitutive active formを様々なレベルで発現するトランスジェニックフィッシュを作製した。これらのさかなでは、低発現での細胞増殖抑制と高発現での細胞増殖亢進というヒトのH-RAS遺伝子の変異の遺伝病であるCostello症候群の特徴がみられた。

<国内外での成果の位置づけ>

我々のゼブラフィッシュにおけるトランスポゾン転移システムを用いたテクノロジーの開発により、非常に簡単にトランスジェニックゼブラフィッシュの作製が可能になった。また、それをもとにして、開発された GFP を用いた遺伝子トラップ法、エンハンサートラップ法、および Gal4 を用いた遺伝子トラップ法、エンハンサートラップ法は、現在、ゼブラフィッシュの遺伝学的研究にとって必要不可欠のものとなっている。これらの研究は国際的にも非常に高く評価されている。また、ゼブラフィッシュ以外のモデル生物における Tol2 を用いた遺伝子導入システムの開発・普及にも力をいれてきた。これらの方法論が国際的にも注目され始められつつある。最近ではニワトリ、マウスなどで Tol2 がさかんに利用されるようになってきた。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

現時点では、研究は順調に進行しており、特に達成できなかったこと、予想外の困難はない。

<今後の課題>

- これまでの研究により、モデル脊椎動物ゼブラフィッシュにおいて、Gal4-UAS 法の実施、in vivo における転移が可能になった。しかしながら、UAS からの遺伝子発現が必ずしも効果的でないケースが見られた。これらの原因は UAS コンストラクトの挿入部位による position effect あるいは effector 遺伝子の codon usage の問題等と考えられた。これらの考えに基づいて、改良・改善を重ね、Gal4 発現細胞の機能変換による信頼性の高いものに改良していく。
- トランスポゾン挿入のホモ 2 倍体の作製により、初期発生異常変異の分離は、それほど高いものではない。新しい遺伝子トラップコンストラクト、エンハンサートラップコンストラクトを作製し、この頻度を上昇させることができるか検討しつつある。さらに効率の良い insertional mutagenesis を目指す。
- 支援班の支援を得て、サンガーセンターで進行中であるゼブラフィッシュゲノムシーケンシングプロジェクトの進捗状況にあわせて、zTrap データベースを改良、改善しつつある。さらにユーザーに使いやすい database の構築を進める。

<成果公表リスト>

- 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 0806242304

Kotani, T., and Kawakami, K.: misty somites, a maternal effect

gene identified by transposon-mediated insertional mutagenesis in zebrafish that is essential for the somite boundary maintenance. *Developmental Biology* 316, 383-396 (2008)

2. 0901131619

Asakawa, K., and Kawakami, K.: Targeted gene expression by the Gal4-UAS system in zebrafish. *Development Growth & Differentiation* 50, 391-399 (2008)

3. 0901131652

Yoshikawa, S., Kawakami, K., and Zhao, X.C.: G2R Cre reporter transgenic zebrafish. *Developmental Dynamics* 237, 2460-2465 (2008)

4. 0901131701

Harada, H., Takahashi, Y., Kawakami, K., Ogura, T., and Nakamura, H.: Tracing retinal fiber trajectory with a method of transposon-mediated genomic integration in chick embryo. *Development Growth & Differentiation* 50, 697-702 (2008)

5. 0901131703

Urasaki, A., Mito, T., Noji, S., Ueda, R., and Kawakami, K.: Transposition of the vertebrate Tol2 transposable element in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 425, 64-68 (2008)

6. 0901131709

Urasaki, A., Asakawa, K., and Kawakami, K.: Efficient transposition of the Tol2 transposable element from a single-copy donor in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 19827-19832 (2008)

7. 0901131727

Santoriello, C., Deflorian, G., Pezzimenti, F., Kawakami, K., Lanfrancone, L., d'Adda di Fagagna, F., and Mione, M.: Expression of H-RASV12 in a zebrafish model of Costello syndrome causes cellular senescence in adult proliferating cells. *Disease models & mechanisms* 2, 56-67 (2009)