

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つつある。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、Tol2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。

<2007年度の研究の当初計画>

- (1)トランスポゾンを用いた遺伝子トラップ法、エンハンサートラップ法を実施し、組織・細胞・器官特異的にGFP遺伝子あるいは転写因子Gal4を発現するゼブラフィッシュ系統を樹立する。
- (2)これらゼブラフィッシュ系統について、発現パターン解析、トランスポゾン挿入部位の決定を行う。
- (3)これらGal4フィッシュとかけあわせることにより、細胞死の誘導、機能阻害、機能変換を行うことができるUASエフェクター系統を作製する。
- (4)遺伝子トラップ法、エンハンサートラップ法の実施により得られたトランスポゾン挿入のホモ2倍体を作製する。発生異常変異を分離し、表現型の解析を行う。

(5)細胞特異的・器官特異的発現パターン、トランスポゾン挿入部位の情報を、昨年度web上で公開を開始したデータベースzTrapに組み込み、データベースのさらなる充実・発展を目指す。zTrapをuser friendlyにし、使いやすくなるように改良する。

<2007年度の成果>

- (1)ゼブラフィッシュにおいてTol2トランスポゾンを用いたGal4遺伝子トラップ法・エンハンサートラップ法の開発に成功した。現在、GFP遺伝子トラップ系統102、GFPエンハンサートラップ系統73、Gal4遺伝子トラップ系統129、Gal4エンハンサートラップ系統56を樹立し、維持している。これらについては、発現パターン解析、トランスポゾン挿入部位決定を進めている。
- (2)トランスポゾン挿入のホモ2倍体を作製し、計15系統の発生異常変異を分離した。それらのうちtcf7遺伝子変異とsynembryon-like遺伝子変異の解析を行い、tcf7遺伝子のヒレ形成における役割、及びsynembryon-like遺伝子のG蛋白質シグナル経路における役割を明らかにした。
- (3)ゼブラフィッシュ卵細胞におけるRNAの局在化に必要な配列を、卵母細胞で特異的な3'UTRをつないだGFP遺伝子を発現するトランスジェニックフィッシュを作製することにより明らかにした。
- (4)心臓で特異的にGFPを発現する遺伝子トラップ系統を用いて、新規ミオシン軽鎖kinase遺伝子の心臓における役割を明らかにした。
- (5)Tol2転移酵素蛋白質の精製を行い、それが実際に活性を有することをXenopus受精卵への微量注入により明らかにした。新しい転移システムの開発につながる可能性がある。
- (6)トランスジェニックフィッシュの作製により、ゼブラフィッシュsquint遺伝子のエンハンサー解析を行い、この遺伝子のポジティブフィードバックによる転写の活性化維持機構を明らかにした。
- (7)Gal4はその認識配列UASを介して転写を活性化する。UASの下流にGFP遺伝子、モノメリックRFP(mRFP)、破傷風毒素遺伝子を組み込んだトランスジェニックフィッシュエフェクター系統を作製した。これらの系統をGal4を組織・細胞特異的に発現するゼブラフィッシュ系統とかけあわせ、脊椎の感覚神経、運動神経、介在神経の特異的に機能阻害実験を行った。この結果、これら異なる神経回路の行動における異なる役割を明らかにした。
- (8)ゼブラフィッシュ遺伝子トラップ・エンハンサートラップデータベースzTrapを改良し、ensemblとの連携を強化した。発現パターン情報と遺伝子情報を効率よく結びつけられるようになった。

<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、世界で初めて 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の開発に成功してきた。これらの研究は国際的にも非常に高く評価されている。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。

<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>

1. 我々の研究により、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が可能であることが示された。しかしながら、この変異が得られる頻度は約40~50挿入に1つとそれほど高いものではない。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に改良を重ね、この頻度を上昇させる。
2. 遺伝子トラップ系統、エンハンサートラップ系統ともに特異的発現に加えて basal level の発現の background の発現が見られる。遺伝子トラップ・エンハンサートラップコンストラクトの改良により、これらを改善する。
3. Gal4-UAS法が実施可能であることを示したが、UASからの遺伝子発現が必ずしも効果的でないケースも見られた。この原因を明らかにし、Gal4発現細胞の機能変換をよる信頼性の高いものに改良していく。
4. 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、改善していく。

<成果公表リスト>

1) 論文 (査読付きのものに限る)

1. 705082037
Kosaka, K., Kawakami, K., Sakamoto, H., and Inoue, K. Spatiotemporal localization of germ plasm RNAs during zebrafish oogenesis. *Mechanisms of Development* 124, 279-289 (2007)
2. 705082041
Scott, E.K., Mason, L., Arrenberg, A.B., Ziv, L., Gosse, N.J., Xiao, T., Chi, N.C., Asakawa, K., Kawakami, K., and Baier, H. Targeting neural circuitry in zebrafish using GAL4 enhancer trapping. *Nature Methods* 4, 323-326 (2007)
3. 707230243
Sato, Y., Kasai, T., Nakagawa, S., Tanabe, K., Watanabe, T., Kawakami, K., and Takahashi Y. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. *Developmental Biology* 305, 616-624 (2007)
4. 801281822
Kawakami, K. *Tol2*: a versatile gene transfer vector in vertebrates, *Genome Biology*, 8 (Suppl 1), S7 (2007)

5. 801281828
Shibano, T., Takeda, M., Suetake, I., Kawakami, K., Asashima, M., Tajima, S., and Taira, M. Recombinant *Tol2* transposase with activity in *Xenopus* embryos. *FEBS letter* 581, 4333-4336 (2007)
6. 801281834
Fan, X., Hagos, E. G., Xu, B., Sias, C., Kawakami, K., Burdine, R. D., and Dougan, S. T. Nodal signals mediate interaction between the extra-embryonic and embryonic tissues in zebrafish. *Developmental Biology* 310, 363-378 (2007)
7. 801281843
Nakada, T., Hoshijima, K., Esaki, M., Nagayoshi, S., Kawakami, K., and Hirose, S. Localization of ammonia transporter *Rhcg1* in mitochondrion-rich cells of yolk sac, gill, and kidney of zebrafish and its ionic strength-dependent expression. *American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 293, R1743-R1753 (2007)
8. 801281850
Seguchi, O., Takashima, S., Yamazaki, S., Asakura, M., Asano, Y., Shintani, Y., Wakeno, M., Minamino, T., Kondo, H., Furukawa, H., et al. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. *The Journal of Clinical Investigation* 117, 2812-2824 (2007)
9. 801281855
Nagayoshi, S., Hayashi, E., Abe, G., Osato, N., Asakawa, K., Urasaki, A., Horikawa, K., Ikeo, K., Takeda, H., and Kawakami, K. Insertional mutagenesis by the *Tol2* transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn-like*. *Development* 135, 159-169 (2008)
10. 801281902
Asakawa, K., Suster, M. L., Mizusawa, K., Nagayoshi, S., Kotani, T., Urasaki, A., Kishimoto, Y., Hibi, M., and Kawakami, K. Genetic dissection of neural circuits by *Tol2* transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 1255-1260 (2008)

2) その他

1. 801281908 (新聞記事)
国立遺伝学研究所：神経回路生きたまま可視化・制御に成功，毎日新聞，2007/01/15
2. 801281911 (和文総説)
浅川和秀、川上浩一，*Tol2* トランスポゾンを用いたゼブラフィッシュ Gal4 エンハンサートラップ法の確立，バイオテクノロジージャーナル (羊土社)，7 巻，603-606.
3. 801281913 (和文総説)
浦崎明宏、川上浩一，脊椎動物におけるトランスポゾンを用いた遺伝学的方法論，実験医学 (羊土社)，25 巻，2507-2512.