

研究種目：基盤研究 (S)

研究期間：2006～2010

課題番号：18101008

研究課題名 (和文) トランスポゾンを用いた Gal4 エンハンサートラップ法による脊椎動物初期発生研究

研究課題名 (英文) Studies on vertebrate development by the transposon-mediated Gal4 enhancer trap method

研究代表者

川上 浩一 (KAWAKAMI KOICHI)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・教授

研究者番号：70195048

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム機能

1. 研究計画の概要

モデル脊椎動物ゼブラフィッシュにおいて Gal4 エンハンサートラップ法を開発し、細胞・組織・器官で Gal4 を特異的に発現するトランスジェニックフィッシュシステムを作製する。また Gal4-UAS システムを開発し、Gal4 発現細胞の視覚化、機能改変、機能阻害を行う。本研究は脊椎動物遺伝学に新しい方法論を確立し、遺伝子機能・ゲノム機能解析のための基盤を築くものである。

2. 研究の進捗状況

(1) メダカトランスポゾン *To12* の転移に必要な最小領域を決定した。これにより、*To12* トランスポゾンベクターが非常にコンパクトになり使いやすくなった。*To12* は急速に国内外のゼブラフィッシュ研究者に普及し、いまや標準的なトランスジェニックフィッシュ作製方法になった。またゼブラフィッシュでの成功により、*To12* 転移システムはカエル、ニワトリ、マウスなど他の脊椎動物細胞への遺伝子導入にもさかんに用いられるようになった。(発表論文5、6)

(2) *To12* 内部にヒートショックプロモーターと改変型 Gal4 (Gal4FF) をもつエンハンサートラップコンストラクト、及び *To12* 内部にスプライスアクセプターと Gal4FF をもつ遺伝子トラップコンストラクトを構築した。これらコンストラクトをゲノムにランダムに挿入させ、200 系統以上のトランスジェニッ

クフィッシュを作製した。これらを Gal4 認識配列 (UAS) の下流に GFP 遺伝子をもつトランスジェニックフィッシュとかけあわせ、Gal4 発現に依存してさまざまな細胞・組織・器官で GFP が特異的に発現することを示した。こうしてゼブラフィッシュにおける Gal4 遺伝子トラップ法・エンハンサートラップ法、Gal4-UAS 法を確立した。(発表論文3)

(3) UAS の下流に破傷風毒素 (TeTxLC) 遺伝子をもつトランスジェニックフィッシュを作製した。ゼブラフィッシュの稚魚は、「触り刺激」に反応して逃避行動を示す (touch response)。様々な神経回路において Gal4 を発現するトランスジェニックフィッシュを UAS:TeTxLC フィッシュとかけあわせ、二重トランスジェニック胚における touch response を解析したところ、脊髄の感覚神経で TeTxLC を発現する胚は「触り刺激」に反応しなかった。また脊髄の介在神経で TeTxLC を発現する胚は「触り刺激」に反応したが異常な逃避行動を示した。この研究により、生きている胚で特定の神経回路を可視化しながらそれらの特定の機能を阻害できることを示した。(発表論文3)

(4) *To12* 挿入のホモ2倍体の解析から、体節形成に重要な新規遺伝子 *misty somites* を発見した。また、*To12* 挿入による Wnt シグナル伝達経路の転写因子 *tef7* 遺伝子の破壊が、ヒレの形態異常を引き起こすことを明らかにした。(発表論文4)

(5) *To12* をゼブラフィッシュゲノムへ効率よく挿入させるために、ヒートショック遺伝子の下流に転移酵素遺伝子をもつトランスジェニックフィッシュを作製した。この転移酵素遺伝子と *To12* をもつ二重トランスジェニックフィッシュのオスを 37 度のお湯につけると、*To12* は生殖細胞で効率よく転移した。この方法により *To12* 挿入の作製が容易になった。(発表論文 1)

(6) 作製したゼブラフィッシュ系統を基に国内外の研究者と共同研究を実施している。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由) 現在までに、700 系統以上の Gal4 トランスジェニックフィッシュを作製している。また、細胞機能可視化のためのさまざまな UAS トランスジェニックフィッシュを作製しつつある。このように申請時の研究目的を既に達成し、それを越えて研究は順調に進捗していると考えられるため。

4. 今後の研究の推進方策

平成 21 年度以降はこれまでの研究の継続とさらなる発展を目指す。

(1) Gal4 遺伝子トラップ法・Gal4 エンハンサートラップ法を実施し、さらなる遺伝子トラップ系統・エンハンサートラップ系統を作製し、細胞・組織・器官特異的に Gal4 を発現する系統を樹立していく。

(2) さらに効率よく神経機能を抑える、あるいは神経機能を可視化する UAS エフェクターフィッシュを開発し、Gal4 トランスジェニックフィッシュを有効利用する。

(3) *To12* 挿入はしばしばゲノム上の遺伝子機能を破壊する。さらに変異効率の高い *To12* コンストラクトの開発等、ゼブラフィッシュ全遺伝子ノックアウトへむけた取り組みを開始する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 34 件)

(1) Urasaki, A., Asakawa, K., and Kawakami, K. Efficient transposition of the *To12* transposable element from a single-copy donor in zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 105, 19827–19832, 2008 (査読有り)

(2) 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 (査読有り)

(3) 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 *To12* transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 1255–1260, 2008 (査読有り)

(4) 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 *To12* transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn-like*. Development 135, 159–169, 2008 (査読有り)

(5) *To12*: a versatile gene transfer vector in vertebrates. Kawakami, K. Genome Biology 8 Suppl 1:S7, 2007 (査読有り)

(6) Urasaki, A., Morvan, G., and Kawakami, K. Functional dissection of the *To12* Transposable Element Identified the Minimal cis-Sequence and a Highly Repetitive Sequence in the Subterminal Region Essential for Transposition. Genetics 174, 639–649, 2006 (査読有り)

[その他]

・ホームページ

<http://kawakami.lab.nig.ac.jp/>

・データベース

zTrap: zebrafish gene trap and enhancer trap database

<http://kawakami.lab.nig.ac.jp/zTrap/>

・新聞掲載

毎日新聞 2008 年 1 月 15 日掲載

「魚の神経回路を制御」