

機関番号：63801
 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

研究成果の概要（和文）：

我々は、モデル脊椎動物ゼブラフィッシュにおいて *To12* トランスポゾンを用いた Gal4 エンハンサートラップ法・遺伝子トラップ法の開発に成功し、発生過程において時空間特異的に Gal4 を発現するトランスジェニックフィッシュ約 1000 系統の作製を行った。これらを基にして、側線、リンパ管、レンズ、網膜、脊索等の器官形成メカニズム、Fanconi 貧血症原因遺伝子の機能を明らかにした。さらに、脊髄の感覚神経、介在神経、および特定の嗅神経の機能を阻害し、それらに起因する行動異常の解析を行った。また、カルシウムイメージングによる運動神経活動の可視化に成功した。このように脊椎動物における発生生物学、神経科学研究のための基盤を構築した。

研究成果の概要（英文）：

We successfully developed the Gal4 enhancer trap and gene trap methods with the *To12* transposable element, and generated more than 1,000 transgenic fish lines that express Gal4 in spatially and temporally restricted fashions during embryonic development. By using these transgenic fish, we disclosed mechanisms of organogenesis including the lateral line, lymphatic system, lens, retina and notochord. Further, we analyzed behavioral abnormalities caused by inhibition of spinal sensory- and inter-neurons and a specific subset of the olfactory sensory neurons. Furthermore, we visualized firing of motor circuits by calcium imaging. Thus, we established the basis for studies of developmental biology and neuroscience in a vertebrate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	16,800,000	5,040,000	21,840,000
2007年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
2008年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
2009年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
2010年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
総計	79,200,000	23,760,000	102,960,000

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・発生遺伝学

1. 研究開始当初の背景

小型熱帯魚ゼブラフィッシュは、脊椎動物の発生・器官形成・行動等高次生命現象を遺伝学的アプローチにより解析するためのモ

デル動物として、1990年代以降世界中でさかんに研究に用いられるようになっていた。しかしながら比較的新しいモデル動物であったため遺伝学的方法論の開発、特に他のモ

デル生物でさかんに利用されてきたトランスポゾンのような有用なツールは未開発であった。

我々は本研究開始時点で、メダカゲノム由来のトランスポゾン *Tol2* が自律的なトランスポゾンであることを証明し、この転移システムをゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションにより導入し、トランスジェニックフィッシュを作製することに成功していた。

Gal4-UAS システムは、目的とする遺伝子を目的とする細胞において発現させることができる非常に有力な方法である。1990 年代にモデル無脊椎動物ショウジョウバエにおいて、トランスポゾン P 因子を用いた Gal4-UAS システムが開発され、遺伝学的研究のための必須な方法としてさかんに利用されていた。しかしながら、研究開始当時ゼブラフィッシュにおいてそのような方法は未開発であった。

2. 研究の目的

本研究において我々は第一に、*Tol2* 転移システムを用いた Gal4-UAS 法を開発、確立することを目指した。第二に、その方法論を実際に実施しゼブラフィッシュを用いた発生生物学、神経科学研究のための基盤を構築することを目指した。以下、箇条書きにする。

(1)ゼブラフィッシュにおいて *Tol2* 転移システムを用いた遺伝子トラップ・エンハンサートラップ法を Gal4 発現に適用し、トランスジェニックフィッシュにおいて Gal4 を時空間特異的に発現させることができる方法論を開発・確立する。

(2)その方法を用いて、Gal4 を特定の細胞・組織・器官で発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを多数作製する。

(3)UAS エフェクタートランスジェニックフィッシュを作製し、Gal4 発現細胞の機能を自在に制御するための方法を開発する。

(4)Gal4 特異的発現トランスジェニックフィッシュを活用して、発生・器官形成のメカニズム、神経回路機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Tol2* トランスポゾンベクターにヒートショックプロモーターと改変型 Gal4 遺伝子 (Gal4FF) を組み込んだエンハンサートラップコンストラクト、および *Tol2* ベクターにスプライスアクセプターと Gal4FF を組み込んだ遺伝子トラップコンストラクトを構築する。これらをもつプラスミド DNA を転移酵素 mRNA とともに受精卵に微量注入し、転移反応によりゲノムにランダムに挿入させ、トランスジェニックフィッシュを作製する。

(2) Gal4FF 発現を可視化するため、Gal4 認識配列 (UAS) の下流に GFP 遺伝子をもつ

UAS:GFP リポーターフィッシュを、*Tol2* を用いたトランスジェネシス法により作製する。Gal4FF がゲノムに組み込まれたトランスジェニックフィッシュと UAS:GFP リポーターフィッシュをかけあわせて得られた胚の GFP 発現を観察することにより、特定の細胞・組織・器官での Gal4FF 発現を同定する。これを大規模に実施する。

(3) トランスジェニックフィッシュゲノムのサザンブロット解析、インバース PCR 解析を行い、*Tol2* 挿入部位を決定する。これにより *Tol2* 挿入の近傍に存在する遺伝子を明らかにする。

(4) UAS の下流に Gal4FF 発現細胞を操作するための遺伝子を組み込んだエフェクターフィッシュを *Tol2* を用いたトランスジェネシス法により作製する。特に Gal4FF 発現神経細胞の機能阻害・活性検出のためのエフェクターフィッシュを作製し、Gal4-UAS 法が予想通り働くか否かを明らかにするとともに、特定の神経回路の機能解析を行う。

(5) Gal4FF 特異的発現トランスジェニックフィッシュを用いて、器官形成のメカニズムを明らかにする。

(6) *Tol2* 挿入が遺伝子を破壊していた場合には、そのホモ 2 倍体を作製することにより、破壊されている遺伝子の機能を解析する。

4. 研究成果

主な研究成果を以下に箇条書きにする。

(1) *Tol2* の転移に必須な最小シス DNA 領域を決定した。これにより、*Tol2* ベクターが非常にコンパクトになり改変・操作が容易になった。その結果、*Tol2* を用いたトランスジェネシス法は国内外のゼブラフィッシュ研究者に普及し、いまや国際的な標準となっている。またゼブラフィッシュでの成功に触発され、*Tol2* 転移システムはカエル、ニワトリ、マウス等他の脊椎動物細胞の遺伝子導入のためにも、さかんに用いられるようになった。

(論文 17, 20)

(2) ゼブラフィッシュゲノムへの *Tol2* 挿入を効率よく行うために、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。この遺伝子と *Tol2* 挿入をゲノムに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 *Tol2* は生殖細胞で効率よく転移した。この方法により *Tol2* 挿入の作製が容易になった。(論文 13)

(3) *Tol2* ベクターに Gal4FF を組み込んだエンハンサートラップコンストラクト、および遺伝子トラップコンストラクトをゲノムにランダムに挿入させ、トランスジェニックフィッシュを作製した。これらを UAS:GFP リポーター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

を特異的に発現させることに成功した。(論文 15, 19)

(4) UAS の下流に破傷風毒素 (TeTxLC) 遺伝子を組み込んだエフェクターフィッシュを作製した。UAS:TeTxLC エフェクターフィッシュを脊髄の感覚神経あるいは介在神経で Gal4FF を発現するトランスジェニックフィッシュとかけあわせたところ、得られた二重トランスジェニック胚において、逃避行動の異常が観察された。(論文 15)

(5) 特定の嗅神経において Gal4FF を発現する系統を同定した。この Gal4FF 発現フィッシュを UAS:TeTxLC エフェクターフィッシュをかけあわせて得られた二重トランスジェニックフィッシュにおいてアミノ酸に対する誘引行動に異常が見られた。即ちアミノ酸に反応する嗅神経を明らかにした。(論文 11)

(6) UAS:TeTxLC エフェクターフィッシュを用いて神経回路機能を阻害することによりゼブラフィッシュの脳内の手綱核が恐怖に対する反応に重要であることを明らかにした。(論文 2)

(7) *To12* 挿入が、母性発現する新規遺伝子 *misty somites* の機能を阻害している系統を見いだした。*misty somites* 遺伝子産物が、体節形成に重要な役割を果たしていること、プロテインキナーゼ A を活性化することにより hedgehog 経路を負に制御していること、を明らかにした。(論文 8, 14)

(8) *To12* 挿入が Wnt シグナル伝達経路の転写因子 *tcf7* 遺伝子を破壊している系統を見いだした。この系統のホモ 2 倍体の解析から、*tcf7* 遺伝子の胸ヒレ形成における役割を明らかにした。また G 蛋白質の活性化に関わる *synembryn-like* 遺伝子が破壊されている系統を見いだした。*synembryn-like* 遺伝子の色素胞形成における役割を明らかにした。(論文 16)

(9) *To12* 挿入がヒト遺伝病 fanconi 貧血症原因遺伝子 *fanc1* のゼブラフィッシュホモログを破壊している系統を見いだした。ゼブラフィッシュ *fanc1* 遺伝子は、卵母細胞を細胞死から防御するために必須であることが明らかになった。(論文 5)

(10) 心臓で特異的に GFP を発現するトランスジェニックフィッシュ系統を見出した。これを用いて、心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼが心筋のサルコメア形成に必須であることを明らかにした。(論文 18)

(11) 網膜で特異的に GFP を発現するトランスジェニックフィッシュ系統を見出した。これを用いて解析することにより Fgf シグナルが網膜の前方、後方のアイデンティティを決定していることを明らかにした。(論文 10)

(12) Gal4FF がリンパ管で特異的に発現している系統を見いだした。この系統を利用し

てリンパ管、動脈、静脈を可視化し、リンパ管内皮細胞が動脈にそって移動することを明らかにした。(論文 6)

(13) Gal4FF が水晶体で発現している系統を見いだした。この系統を用いてユビキチン依存性プロテアソーム系が水晶体繊維細胞の分化に必須であることを明らかにした。(論文 4)

(14) Gal4FF が脊索で発現している系統を見いだした。この系統を用いて脊索細胞が液胞と非液胞細胞に分化する際に Notch シグナルが重要であることを明らかにした。(論文 7)

(15) Gal4FF が側線で特異的に発現している系統を見いだした。この系統を利用して側線の求心性ニューロンが体表上の有毛細胞の向きを認識してシナプスを形成することを明らかにした。(論文 12)

(16) トランスジェニックフィッシュを GFP あるいは Gal4FF の発現パターン、あるいは *To12* 挿入近傍に存在する遺伝子名から検索できるデータベースを構築し、公開した。(論文 3) 現在までに、約 1000 系統トランスジェニックフィッシュを作製し、そのうち約 500 のトランスポゾン挿入部位を決定している。

(17) 改良型カルシウムインディケーター GCaMP を開発し、UAS の下流に GCaMP 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 UAS:GCaMP フィッシュを脊髄の運動神経回路で Gal4 を発現するトランスジェニックフィッシュとかけあわせ、稚魚の運動時における運動神経の発火のカルシウムイメージングに成功した。(論文 1)

(18) *To12* トランスポゾンを BAC プラスミドに組み込み、巨大 DNA のトランスジェネシスに成功した。(論文 9)

5. 主な発表論文等

(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 72 件)

以下に主な発表論文をあげる (全て査読あり)。

- (1) Muto, A., Ohkura, M., Kotani, T., Higashijima, S.-i., Nakai, J., and Kawakami, K. Genetic visualization with an improved GCaMP calcium indicator reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 108, 5425-5430 (2011).
- (2) Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, T., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., Sassa, T., Amo, R., Shiraki, T., Kawakami, K., Hosoya, T.,

- Higashijima, S., and Okamoto, H. The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. **Nature Neuroscience** 13, 1354-1356 (2010).
- (3) Kawakami, K., Abe, G., Asada, T., Asakawa, K., Fukuda, R., Ito, A., Lal, P., Mouri, N., Muto, A., Suster, M.L., Takakubo, H., Urasaki, A., Wada, H., and Yoshida, M. zTrap: zebrafish gene trap and enhancer trap database. **BMC Developmental Biology** 10, 105 (2010).
- (4) Imai, F., Yoshizawa, A., Fujimori-Tonou, N., Kawakami, K., and Masai, I. The ubiquitin proteasome system is required for cell proliferation of the lens epithelium and for differentiation of lens fiber cells in zebrafish. **Development** 137, 3257-3268 (2010).
- (5) Rodríguez-Mari, A., Cañestro, C., Bremiller, R.A., Nguyen-Johnson, A., Asakawa, K., Kawakami, K., and Postlethwait, J.H. Sex reversal in zebrafish *fancl* mutants is caused by Tp53-mediated germ cell apoptosis. **PLoS Genetics** 6:e1001034 (2010).
- (6) Bussmann, J., Bos, F.L., Urasaki, A., Kawakami, K., Duckers, H.J., and Schulte-Merker, S. Arteries provide essential guidance cues for lymphatic endothelial cells in the zebrafish trunk. **Development** 137, 2653-2657 (2010).
- (7) Yamamoto, M., Morita, R., Mizoguchi, T., Matsuo, H., Isoda, M., Ishitani, T., Chitnis, A.B., Matsumoto, K., Crump, J.G., Hozumi, K., Yonemura, S., Kawakami, K., and Itoh, M. Mib-Jag1-Notch signalling regulates patterning and structural roles of the notochord by controlling cell-fate decisions. **Development** 137, 2527-2537 (2010).
- (8) Kotani, T., Iemura, S.I., Natsume, T., Kawakami, K., and Yamashita, M. Mys protein regulates protein kinase A activity by interacting with regulatory type Ia subunit during vertebrate development. **The Journal of Biological Chemistry** 285, 5106-5116 (2010).
- (9) Suster, M.L., Sumiyama, K., and Kawakami, K. Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish and mice. **BMC Genomics** 10, 477 (2009).
- (10) Picker, A., Cavodeassi, F., Machate, A., Bernauer, S., Hans, S., Abe, G., Kawakami, K., Wilson, S.W., and Brand, M. Dynamic coupling of pattern formation and morphogenesis in the developing vertebrate retina. **PLoS Biology** e1000214 (2009).
- (11) Koide, T., Miyasaka, N., Morimoto, K., Asakawa, K., Urasaki, A., Kawakami, K., and Yoshihara, Y. Olfactory neural circuitry for attraction to amino acids revealed by transposon-mediated gene trap approach in zebrafish. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 106, 9884-9889 (2009).
- (12) Faucherre, A., Pujol-Martí J., Kawakami, K., and López-Schier, H. Afferent neurons of the zebrafish lateral line are strict selectors of hair-cell orientation. **PLoS ONE** 4, e4477 (2009).
- (13) 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).
- (14) 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).
- (15) 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).
- (16) 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 *synembryon-like*.
Development 135, 159-169 (2008).
- (17) Kawakami, K. *Tol2*: a versatile gene transfer vector in vertebrates. **Genome Biology** 8 Suppl 1:S7 (2007).
- (18) Seguchi, O., Takashima, S., Yamazaki, S., Asakura, M., Asano, Y., Shintani, Y., Wakeno, M., Minamino, T., Kondo, H., Furukawa, H., Nakamaru, K., Naito, A., Takahashi, T., Ohtsuka, T., Kawakami, K., Isomura, T., Kitamura, S., Tomoike, H., Mochizuki, N., and Kitakaze, M. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. **The Journal of Clinical Investigation** 117, 2812-2824 (2007).
- (19) 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).
- (20) Urasaki, A., Morvan, G., and Kawakami, K. Functional dissection of the *Tol2* transposable element identified the minimal *cis*-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. **Genetics** 174, 639-649 (2006).

[学会発表] (計 151 件)

以下に主な学会発表をあげる (全て招待講演)。

- (1) Kawakami, K. The *Tol2*-mediated Gal4-UAS system and its application to the study of functional neural circuits in zebrafish. Imaging structure and function in the zebrafish brain. Dec 13-15, 2010.
- (2) Kawakami, K. Transgenesis and genome analysis with the *Tol2* transposable element in mice and zebrafish. FASEB summer research conference. Steamboat, USA. Jun 6-11. 2010.
- (3) Kawakami, K. Recent advances in the *Tol2* transposon technology in zebrafish. 3rd Strategic Conference of Zebrafish Investigators. Asilomar, USA. Jan 24-28, 2009.
- (4) Kawakami, K. Transposon-mediated gene trapping and enhancer trapping in zebrafish.

- 6th Annual International Conference on Transposition and Animal Biotechnology. Berlin, Germany. June 19-21, 2008.
- (5) Kawakami, K. Genetic dissection of neural circuits by *Tol2* transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. Asia Pacific Zebrafish Network Meeting. Auckland, New Zealand. Feb 17-20, 2008.
- (6) Kawakami, K. Transposon-mediated gene trapping and enhancer trapping in zebrafish. Developmental Biology and Biomedical Research. Agra, India. Oct 18-19, 2007.
- (7) Kawakami, K. Transposon-mediated gene and enhancer trapping in zebrafish. The 16th Korea Genome Organization Conference. Seoul, Korea. Sep 13-14, 2007.

[図書] (計 1 件)

- (1) Lieschke, G.J., Oates, A.C., Kawakami, K., Humana Press (New York), *Zebrafish: methods and protocols* (2009).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ボツリヌス毒素遺伝子トランスジェニックフィッシュ

発明者: 川上 浩一, サスター マキシミリアーン

権利者: 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2009-211821

出願年月日: 2009 年 9 月 14 日

国内外の別: 国内

[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/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 浩一

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・教授

研究者番号: 70195048