

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659085

研究課題名(和文) 神経系を可視化したゼブラフィッシュを用いた神経特異的転写調節因子 D p f 1 の解析

研究課題名(英文) Studies on the neuron-specific transcriptional regulator Dpf1 using transgenic zebrafish expressing neuronal tracers

研究代表者

吉川 知志 (Kikkawa, Satoshi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90244681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュ中枢神経系における最も主要なdpf1トランスクリプトdpf1-002を決定し、塩基配列と胚における発現パターンを明らかにした。また、dpf1-tTA-GFPフィッシュにおいては、GFPトランスジェンがdpf1-002とは異なる転写開始位置から独立して転写されており、内在性dpf1-002の発現は影響を受けていなかった。dpf1-002に対するモルフォリノアンチセンスオリゴ(MO)による機能阻害実験を行ったが、再現性のある明確な神経系発生異常は見つかっていない。今後は、ゲノム編集などの異なる遺伝子ターゲティング法の検討も必要であろう。

研究成果の概要(英文)：We indentified a main dpf1 transcript, dpf1-002, in the zebrafish central nervous system and determined the nucleotide sequence and expression pattern in embryos. In addition, in the dpf1-tTA-GFP fish, the GFP transgene was transcribed from the start point different from that of dpf1-002, and the expression of endogenous dpf1-002 was not affected by the expression of the transgene. We intend functional inhibition using morpholino antisense oligonucleotides (MO) for dpf1-002, but unfortunately have not yet observed clear-cut developmental nerve defects in the injected embryos. Examination such as the coinjection of different MOs is necessary. The different gene targeting approach such ad genome editing may also be needed in future.

研究分野：神経解剖学

キーワード：クロマチン再構成複合体 神経細胞分化

1. 研究開始当初の背景

個体の発生をナビゲートする転写因子カスケードなどの内因性メカニズムと外因性シグナルへの応答の動的バランスを解析することは発生学上の重要課題である。

Brg/Brm-associated factor (BAF) 複合体は、10 個のコアサブユニットからなるクロマチン再構成複合体で、ヒストン-DNA 間の相互作用の制御を介して遺伝子発現調節に関与する。種を超えて高度に保存された BAF 複合体には、一部のサブユニットのアイソフォームの違いによる多型が存在する。例えば、esBAF、npBAF、nBAF は、それぞれ ES 細胞、神経前駆細胞、分化ニューロンに特異的なサブユニットを含み、発生の進行と共にアイソフォーム交換により順次移行し、各ステージに必要な遺伝子発現を実現すると考えられる。Dpf1 は、以前は Neud4 と呼ばれ、長らく機能未知の DNA 結合分子と考えられていたが、前述の nBAF 複合体に特異的なサブユニットとして新たに同定された BAF45b と同一分子であることが判明し、ニューロン分化や分化後の機能発現に関わる因子としてにわかに注目されている [Lessard, et al. (2007) Neuron 55:201-215]。しかし、Dpf1 が関与する神経発生イベントの詳細やその機能メカニズムについては大部分が未解明であり、さらなる研究が必要である。

一方、申請者らは、ゼブラフィッシュに tTA-EGFP 融合遺伝子を用いたエンハンサートランプ挿入を行い、中枢神経系に発現を示す系統中に dpf1 遺伝子座の約 1 Mb 上流に挿入をもつ系統 (dpf1-tTA-GFP) を得た。予備検討ではこの系統の GFP 発現パターンは dpf1 の発現パターンとよく一致しており、Dpf1 の機能解析に大変有用であると判明した。そこで、小型で透明性が高く短時間に体外発生する胚や、dpf1-tTA-GFP 以外にも様々な蛍光レポーターのトランスジェニック系統が利用できる利点を生かし、Dpf1 の発現阻害等により機能解析を行う本研究計画を着想するに至った。

2. 研究の目的

神経系の機能発現の礎となる発生イベントを時空間的に制御するメカニズムの個体レベルでの理解を目指し、BAF クロマチン再構築複合体の神経特異的構成サブユニット Dpf1 (BAF45b) の機能解析を行う。mRNA 転写産物の塩基配列解析、遺伝子とタンパク質双方の詳細な発現パターン解析などにより発現部位と時期の詳細を明らかにしていく。また、dpf1-tTA-GFP トランスジェニックゼブラフィッシュにおける GFP 発現細胞を解析し、Dpf1 転写産物の発現パターンとの比較を行う。蛍光レポーターを発現する各種ゼブラフィッシュ系統を利用した Dpf1 遺

伝子の発現阻害実験等により、神経分化、細胞移動、樹状突起発生、回路形成等の障害を個体レベルで解析し、神経細胞の分化過程における Dpf1 の機能を俯瞰的に解析する。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュ Dpf1 転写産物の詳細な構造解析

ゼブラフィッシュの Dpf1 の転写産物 (mRNA) の構造を RT-PCR 法を用いて増幅した cDNA の塩基配列の解析により行う。ゲノムデータベースに登録されているゼブラフィッシュの Dpf1 遺伝子の構造情報との比較により転写開始位置や転写産物の多型を明らかにし、以降の研究に役立てる。

(2) ゼブラフィッシュ Dpf1 の発現パターンの詳細な解析

ゼブラフィッシュの Dpf1 の mRNA およびタンパク質の主として中枢神経系における発現パターンを発生ステージを追って詳細に解析する。受精卵より成体までのホルマウントあるいは中枢神経系切片を作製し、in situ ハイブリダイゼーション (ISH) 法と免疫組織化学 (IHC) 法によりそれぞれ発現パターンを明らかにしていく。

(3) dpf1-tTA-GFP トランスジェニックフィッシュの GFP 発現パターン解析

申請者らが作成した dpf1-tTAGFP トランスジェニックフィッシュの GFP 発現パターンを発生ステージを追って詳細に解析する。

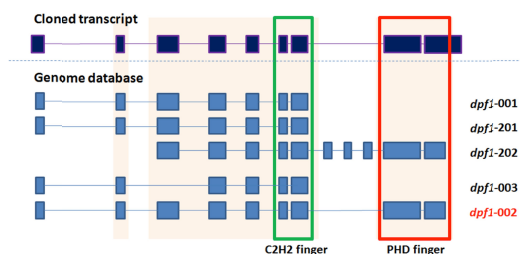
(4) 遺伝子ターゲティングによる Dpf1 の機能解析

ゼブラフィッシュ dpf1 に対するモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) を受精卵にマイクロインジェクションすることにより発現阻害を行い、神経系の発生に対する様々な影響を検討する。蛍光タンパク質発現トランスジェニックゼブラフィッシュを適材適所に使用することにより、他のモデル系では代替困難な形態解析を行う。

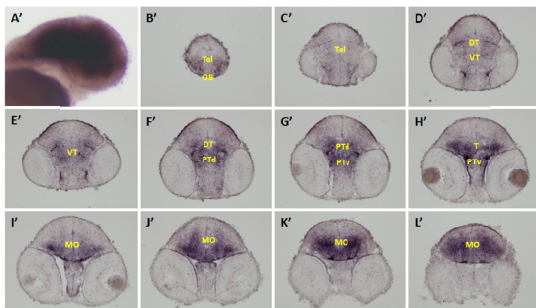
4. 研究成果

(1) RT-PCR 法によりゼブラフィッシュ胚で実際に発現している dpf1 遺伝子の転写産物を増幅し、塩基配列を解析した。その結果、dpf1 遺伝子には転写開始点異なる複数の転写バリエーションが存在することを見出した。これらのバリエーションは分子内の機能モチーフの有無が異なり、バリエーション間に機能性の差異がある可能性が予想されるため、機能メカニズムの検討には各バリエーションの発現パターンを明らかにする事が極めて重要であると考えられた。最終的に、ゼブラフィッシュ中枢神経系における最も主要な dpf1 トランスクリプトとして dpf1-002 を同定した(次図)。

このトランスクリプトは、dpf (BAF45) ファミリーに共通の DNA 結合モチーフである C2H2 型と PHD 型の 2 つの Zinc フィンガーの双方を有しており、他の動物種のデータベース等に登録されている dpf1 との相同性が非常に高いがゼブラフィッシュにおいてはこれまで発現の有無が未確認のトランスクリプトであった。また、PHD 型の Zinc フィンガーを欠く短いトランスクリプトも確認された。

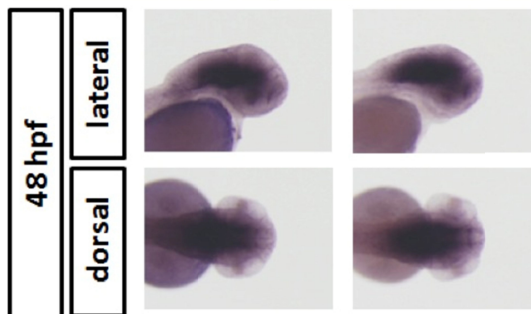
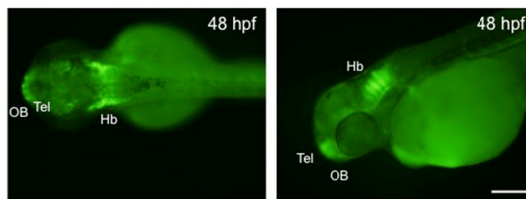


(2) 現有の抗体は、当初予想された dpf1 バリエーションを広く検出する目的で共通性が高いと予想された領域を抗原としているため、特定のバリエーションを選択的に検出することはできない。そこで、それぞれのバリエーションを特異的に検出可能な ISH プローブの作製を試みたが、配列が互いに異なる領域が小さく特異的なプローブを作成できないバリエーションもあった。最終的に、主要な dpf1 トランスクリプト (dpf1-002) に比較的特異的な領域とほぼすべてのバリエーションに含まれる共通領域の 2 種類のプローブにより得られた発現パターンの比較から、dpf1-002 が主要な転写産物であると考えられた。一方、明らかに発現パターンの異なる転写産物の存在は見出されなかった。また、ホールマウント標本による解析に加え、凍結切片を用いてより詳細な発現解析を行った。その結果、dpf1 は間脳や延髄腹側部などに特に強い発現が認められる一方で、終脳外蓋や中脳視蓋など発現が検出できないか極めて弱い領域があることが判った (次図)。これは、dpf1 以外にも nBAF の構成サブユニットとなり得る類似分子の存在を示唆している。



(3) dpf1-tTA-GFP トランスジェニックフィッシュにおける GFP トランスジーン発現解析を行い、GFP 遺伝子は dpf1 遺伝子座のエクソン 8 と 9 の間のイントロン領域に挿入されていること、この融合トランスジーンは dpf1-002 とは異なる位置から転写開始される独立した融合トランスクリプトとして転

写、翻訳されていることがわかった。当該トランスジェニックフィッシュにおいても内在性 dpf1 遺伝子は野生型同様に発現していると考えられた為、野生型とトランスジェニックフィッシュにおける dpf1-002 の発現パターンの比較を行ったところ、双方の間に明確な差異は認めなかった。このことは dpf1-tTA-GFP トランスジェニックフィッシュの神経系の発生に明らかな異常を認めないことを裏付ける結果となった。この融合トランスクリプトの元となる内在性トランスクリプトの生理的意義は不明である。



受精後 2 日胚における GFP 融合タンパク質と内在性 dpf1-002 の発現パターン (上)

(4) 主要トランスクリプトである dpf1-002 の塩基配列に対して、まず 3 種類の翻訳阻害モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) を作製し、発現阻害実験を行った。dpf1-tTA-GFP フィッシュに加えて、HuC-kaede, islet1-GFP, zFucci などの受精卵にも各 MO を注入したが、現在までのところ再現性をもって認められる明確な神経系の発生異常は残念ながら見つからない。さらに転写された RNA のスプライシングサイトをターゲットとするスプライシング阻害型の MO を 3 種類作成した。これらについても研究期間内には明確な機能阻害を示す結果を得ることができず、現在も解析が続いている。いずれの MO も阻害効果が期待に反して弱く、正常な Dpf1 蛋白質の発現を十分に阻害できていない可能性が高い。異なる MO や複数の MO の同時注入等の検討が必要と思われる。CRISPR-CAS9 システムを用いたゲノム編集等による、異なる遺伝子ターゲティングアプローチも将来的には検討対象となる。スプライシングバリエーションや類似分子による機能の冗長性についても、さらに詳細な検討の余地がある。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

Satoshi Kikkawa, Takayuki Sumimoto, Takuya Sumi, Yoshiaki Sakihama, Toshio Terashima, Functional analysis of the Reelin-Dab1 signal pathway in the developing zebrafish nervous system, Society for Neuroscience Annual meeting 2014, 2014年11月18日, Washington, DC (United States)

鷺見拓哉、崎浜吉昭、寺島俊雄、吉川知志、ゼブラフィッシュ dpf1 遺伝子の新規転写産物の解析、第119回日本解剖学会全国学術集会、2014年3月29日、自治医科大学(栃木県・下野市)

吉川知志、角本貴進、崎浜吉昭、寺島俊雄、ゼブラフィッシュ小脳皮質発生における Reelin シグナルの機能解析、第118回日本解剖学会全国学術集会、2013年3月29日、かがわ国際会議場(香川県・高松市)

角本貴進、崎浜吉昭、寺島俊雄、吉川知志、ゼブラフィッシュ神経系の発生における Reelin-Dab1 シグナルの機能解析、第35回日本神経科学大会、2012年9月21日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 知志 (KIKKAWA, Satoshi)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号： 90244681

(3) 連携研究者

寺島 俊雄 (TERASHIMA, Toshio)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号： 20101892