

令和元年6月10日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04819

研究課題名(和文)脊椎動物の社会性行動の遺伝・神経基盤の解明

研究課題名(英文)Genetic and neural basis of social behaviors in vertebrates

研究代表者

成瀬 清(Naruse, Kiyoshi)

基礎生物学研究所・IBBPセンター・特任教授

研究者番号：50208089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：c-fos/egr1のプロモーターの下流にDD\_mClover3をノックインした系統を樹立し、てんかん誘導剤であるPTZを用いて、神経興奮依存にDD\_mClover3の発現量が上昇するかを確認した。その結果Tg(c-fos:DD\_mClover3)ではDD\_mClover3の発現量が約1.5-6倍に上昇した。またTg(egr1:DD\_mClover3)系統では同じ処理により発現量が1.9倍に上昇した。CRISPR-Cas9を用いたゲノム編集によってSWS1、SWS2、LWSの各遺伝子に関するKO個体を樹立することができた。またSWS1特異的モノクローナル抗体を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

初期応答遺伝子c-fos/egr1を利用してメダカにおいて特定の行動に関わる神経回路網を可視化できる系統を樹立することができた。これにより生殖行動後に発現するDD\_mClover3蛍光を指標としメダカの生殖行動によって活性化される神経回路網の同定を行う準備が完了した。またSWS1、SWS2、LWS遺伝子のノックアウト個体を樹立できたことからメダカ色覚の行動や配偶者選択への影響を調べる準備が完了した。さらにSWS1特異的なモノクローナル抗体を樹立できたのでタンパク質レベルの網膜構造を調べることも可能となった。

研究成果の概要(英文)：We have established the KI(c-fos/egr1: DD\_mClover3) lines and analyzed the up regulation of DD\_mClover3 by TMP(epilepsy inducer). We have detected DD\_mClover3 expression 1.5-6 times higher than untreated medaka in KI(c-fos: DD\_mClover3) line and 1.9 times higher than untreated medaka in KI(egr1: DD\_mClover3) line. These two lines may be useful for visualization of neural networks based on the specific behavior using DD\_mClover3 expression. We successfully established KO individuals of the SWS1, SWS2 and LWS genes by CRISPR-Cas9. In addition, we could obtain SWS1 specific monoclonal antibody.

研究分野：遺伝学

キーワード：c-fos egr1 DD\_mClover3 ノックイン オプシン遺伝子 ノックアウト系統 SWS1モノクローナル抗体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

メダカは我が国で古くから用いられてきたモデル小型魚類である。水面近くに生息するメダカの特徴として、視覚が高度に発達していることがあげられる。また最近の我々の研究からメダカは視覚・色覚によって個体差を認識し、(Fukamachi et al 2009, BMC Biology)、個体記憶に基づき配偶者を選択していることが明らかとなった (Okuyama et al. 2014, Science)。メダカのメスは近くにいたオスを視覚記憶し、「見知った相手」を性的パートナーとして選択する傾向がある。また点を連ねた抽象的なメダカモデル (バイオロジカルモーション) を同種個体と認識することができる (Nakayasu and Watanabe, 2014, Anim. Cogn.)。このような最新の国内の研究からメダカは高度で視覚的な社会認知能力を持つことが明らかになった。従来の研究モデルである齧歯類は夜行性のため嗅覚系を介して社会行動を示し、二色系の色覚しか持たない。そこでヒトに見られるような視覚的な社会認知能力の研究材料として十分ではないことが指摘されてきた。さらにメダカはマウスと比較して大量の個体を用いて実験することが可能であり、機能的な遺伝子や神経回路を網羅的に検索し、同定したシステムの遺伝的変異による個体間の差を明らかにする研究に適している。このような観点から我々は過去 10 年にわたり、社会性行動の神経基盤を構造と機能の両面から解析できる新たな実験系を、メダカを用いて構築してきた。これらの研究成果は Science、PLoS Genetics 等に掲載されている。これらの研究は変異体と野生型を用いた行動実験、行動多様性を用いた連鎖解析による遺伝学的解析及び電気生理学的解析を駆使した研究である。しかし現在齧歯類の研究で多く用いられている特定の神経回路を刺激依存的に可視化する系統やその興奮をリアルタイムでモニターする系統、神経興奮を可逆的に抑制する系統はメダカではまだ樹立されていない。

### 2. 研究の目的

近年小型魚類でもテタヌス毒素軽鎖遺伝子を特定の組織で発現させ機能抑制する系 (Asakawa et al 2008 PNAS) や低分子化合物依存的に GFP 発現を制御する DD\_GFP 系 (Froschauer, A. et al 2015 PLoS One) が報告されている。また Cre 組換え酵素を熱ショック依存的に発現させることで特定の細胞を様々な色で可視化する Gaudi 系統 (Centanin et al. 2014 Development) も報告されている。今回の研究計画では神経回路網を刺激と低分子化合物依存性に可視化できる系統を樹立する。この系統では初期発動遺伝子である c-fos 或いは egr 遺伝子座に不安定化ドメインをもつ組換え酵素 Cre(DD\_Cre) をもつカセットを挿入し、神経刺激依存性に Cre(DD\_Cre) を発現する系統を樹立する。8 種類のオプシンからの入力経路とその配偶者選択行動への影響を 1) 及び 2) で作成した遺伝子導入系統を用いて解析する。そのためオプシン遺伝子のノックアウト (KO) 系統を樹立する。紫外及び赤オプシンに関しては既に KO 系統を樹立しているため、青及び緑オプシンとロドプシンに関して CRISPR-Cas9 によるゲノム編集により KO 個体の作成を継続する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 刺激依存的に神経系を可視化できる系統の作成

初期応答遺伝子である c-fos 或いは egr 遺伝子座に我々が新たに開発した NHEJ を用いたノックイン法を用いて不安定化ドメインをもつ組換え酵素 Cre(DD\_Cre) を発現する系統を樹立する。樹立した系統を用いて安定化剤 TMP 存在下で PTZ (ペンチレンテトラゾール) 投与によって c-fos 或いは egr 発現を誘導し Cre(DD\_Cre) の活性が上昇するのかについてレポーター系統を用いて検証する。

#### (2) オプシンノックアウト系統の樹立

体色による配偶者への強い選好性を示す ci 系統を用いてオプシン遺伝子に対する gRNA を作成し、オプシン遺伝子のノックアウト (KO) 系統を樹立する。赤オプシンに関しては既に KO 系統を樹立しているため、青及び緑オプシンとロドプシンに関して CRISPR-Cas9 によるゲノム編集により KO 個体を作成する。また紫外オプシンについても以前樹立した系統は 2nd メチオニンがあるため赤オプシンで機能欠損変異体の表現型を示す領域と相同な領域に新たな gRNA を作成し、完全な機能欠損系統を作成する。

### 4. 研究成果

#### (1) 刺激依存的に神経系を可視化できる系統の作成

樹立した TG(c-fos:DD\_Cre) 系統をコピキタスな Gaudi 及び GFP レポーター系統と交配し、TMP 存在下で PTZ 処理し、脳内で c-fos 依存性の Cre 発現による組換えに由来する蛍光を観察したが明確なシグナルを検出することができなかった。そこで c-fos:DD\_Cre プラスミドをリポーター系統に直接導入して組換え活性を検討したところ fosmid クローンを用いた遺伝子導入では脳内の c-fos のプロモーター活性を十分に再現できないことが示唆された。そこで我々が独自に開発した knock-in 用のドナーベクター-hsP:GFP を c-fos 遺伝子座 5' 領域に導入し PTZ 処理をしたところ、PTZ 依存性の GFP 蛍光を脳内で検出することに成功した。次に HsP:DD\_GFP ドナーベクターを作成し、TMP 存在下で PTZ による c-fos の誘導を行ったところ、脳内での GFP 発現を検出することができた。同時に HsP:DD\_Cre をコピキタスな GFP レポーター系統に導入したところ TMP 処理なしでもかなり多くの組織で組換えが誘導された。この結果から HsP:DD\_Cre はかなりリークがあることが明らかとなった。一方で神経系に特異的はリポーター系統 Tg

(HuC:loxP-DsRed-loxP-GFP)に導入した場合には、TMP 存在下での PTZ 処理によりかなり特異的な組換えが神経系で観察されることも明らかとなった。これらのデータから神経興奮に由来する c-fos 発現を GFP などの蛍光タンパク質で再現するためには knock-in による de novo プロモーターの利用が必須で、DD\_Cre による組換えによって神経系をラベルするためには適切な神経特異的リポーターシステムを選択する必要があることが明らかとなった。そこでまず c-fos/egr1 のプロモーターの下流に DD\_mClover3 をノックインした。その後、掛け合わせを繰り返し Tg(c-fos : DD\_mClover3) は、PCR にてノックインが確認されている F1 個体 (幼魚) にて、Tg(egr1 :DD\_mClover3) は F2 個体 (稚魚) を用いて、てんかん誘導剤である PTZ を処理した。その結果、神経興奮依存に DD\_mClover3 の発現量上昇が確認できた。そこでまず、本研究における PTZ を用いた神経興奮誘導実験系の確立を Tg(c-fos : DD\_mClover3) システムを利用して行った。その結果、PTZ による神経興奮依存に c-fos の発現量が約 50 倍~80 倍に上昇することを確認した。次に同個体を用いて、神経興奮依存に DD\_mClover3 の発現量が上昇するかを確認した。その結果、神経興奮依存に DD\_mClover3 の発現量が約 1.5~6 倍に上昇することを確認した。また PTZ による神経興奮を誘導していないにも関わらず DD\_mClover3 の basal expression が高い個体 (#2、 #7) が存在することも明らかとなった。これは非相同末端修復を利用しノックインを行ったため、個体ごとに DD\_mClover3 がノックインされた位置にばらつきが生じ転写制御機構に影響を与えたためと考えられる。また、同様の実験を Tg(egr1 :DD\_mClover3) システムの稚魚を用いて行った。まず、egr1 が PTZ による神経興奮依存に発現量が上昇するかを検証した。その結果、約 4~8 倍の発現量上昇を確認した。次に、DD\_mClover3 の発現量上昇を確認すると約 1.9 倍の発現量上昇が確認された。以上より Tg(c-fos : DD\_mClover3、 egr1 :DD\_mClover3) の両システムにおいて DD\_mClover3 が神経興奮依存に発現量が上昇することが確認された。

#### (2) オプシンノックアウトシステムの樹立

CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集によって SWS1、SWS2、LWS の各遺伝子に関する KO 個体を樹立することができた。タンパク質レベルでの発現を解析するためオプシン遺伝子のアミノ酸配列を比較して保存性が低い N 末領域を選択して SWS1 と LWS の 2 種類の遺伝子について N 末の合成ペプチドを作成した。そのペプチドを抗原としてラット腸骨リンパ節法を用いてモノクローナル抗体を作成した。野生型と変異体の網膜切片を用いて抗体のスクリーニングを行ったところ SWS1 の N 末領域特異的なモノクローナル抗体を得ることができた。市販のウシロドプシンの C 末の 9 アミノ酸をエピトープとした市販抗体ではメダカの LWS を、ラット網膜 (ロドプシンの N 末端 4 ~ 10 番目のアミノ酸配列) をエピトープとした市販抗体では Rh1 が特異的に認識されることが明らかになっている。今後は KO 個体を用いてこれらの抗体を用いて免疫組織化学的手法によりタンパク質レベルでのオプシン発現を調べるとともに変異体と野生型の組織構築の違いを免疫組織化学的手法と組織切片及び flat-mount 免疫染色にて明らかにする。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Watakabe, I., Hashimoto, H., Kimura, Y., Yokoi, S., Naruse, K., and Higashijima, S. I. (2018). Highly efficient generation of knock-in transgenic medaka by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Zoological Letters*, 4(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40851-017-0086-3> (査読あり)

### 〔学会発表〕(計 0 件)

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

バイオリソース研究室

[http://www.nibb.ac.jp/sections/evolutionary\\_biology\\_and\\_biodiversity/naruse/](http://www.nibb.ac.jp/sections/evolutionary_biology_and_biodiversity/naruse/)

成瀬 清 研究業績等

[https://www.researchgate.net/profile/Kiyoshi\\_Naruse](https://www.researchgate.net/profile/Kiyoshi_Naruse)

<https://orcid.org/0000-0001-9185-3495>

NBRP Medaka

<https://shigen.nig.ac.jp/medaka/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：安齋 賢

ローマ字氏名：Satoshi Ansai

所属研究機関名：自然科学研究機構

部局名：基礎生物学研究所

職名：助教

研究者番号（8桁）：20779467

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：竹内 秀明

ローマ字氏名：Hideaki Takeuchi

研究協力者氏名：横井 佐織

ローマ字氏名：Saori Yokoi

研究協力者氏名：深町 昌司

ローマ字氏名：Shoji Fukamachi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。