

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02370

研究課題名(和文)トランスポゾンを用いた遺伝子トラップに基づく新しい生命科学研究の基盤創成

研究課題名(英文) Building new foundation for biological sciences based on transposon-mediated gene trapping

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 遺伝子トラップスクリーンを実施し、さまざまな細胞・組織・器官特異的にGal4FFを発現するトランスジェニックフィッシュを多数作製した。これらの系統におけるトランスポゾン挿入部位を決定した。
 (2) 細胞・組織・器官特異的Gal4FF発現トランスジェニックフィッシュを基に共同研究を実施し研究成果を英文論文40報として発表した。
 (3) ボツリヌス毒素遺伝子を用いてGal4FF発現神経細胞の機能を効率良く阻害するシステムの開発に成功した。カルシウムイメージングを行い、エサなどの視覚刺激が食欲の中枢である視床下部下葉を活性化する神経回路を発見した。恐怖条件付け学習に必須な終脳の神経回路を同定した。

研究成果の概要(英文)：(1) We performed a gene trap screen using the Tol2 transposon system and identified a large number of transgenic fish expressing Gal4FF specifically in various cells, tissues and organs. We analyzed the transgenic fish by Southern blot and PCR, and mapped the transposon insertions on the zebrafish genome.
 (2) We conducted collaborative research with experts of the studies of developmental biology and organogenesis based on the transgenic fish lines expressing Gal4FF. The results were published as 40 articles written in English.
 (3) We succeeded in developing a system using the botulinum toxin gene that can efficiently inhibit the function of Gal4FF expressing neurons. By performing calcium imaging, we discovered a neural circuit that connects a visual stimulus with the inferior lobe of the hypothalamus, which is the center of appetite. We succeeded in identifying a neuronal population in the telencephalon, that is essential for fear conditioning.

研究分野：発生遺伝学、神経科学、ゲノム科学

キーワード：ゲノム 遺伝子 遺伝学 神経科学 発生・分化 ゼブラフィッシュ 遺伝子トラップ

1. 研究開始当初の背景

ゼブラフィッシュは、(1) 繁殖・大量飼育が容易である、(2) 胚が透明で胚操作・観察が容易である、等の特長を有するため、遺伝学的解析が可能なモデル脊椎動物として、1990年代以降、世界中の研究者により用いられてきた。しかしながら比較的新しいモデル生物であるために、1990年代後半頃には遺伝学的解析のための方法論の開発は十分ではなかった。とりわけ、トランスジェニックフィッシュ作製のための方法は非常に効率のわるいものであった。

この状況を大きく変えたのは、我々が開発したトランスポゾン転移技術であった。トランスポゾンは、微生物、植物、ショウジョウバエ等の遺伝学・分子生物学研究において有用なツールとして用いられてきたが、1990年代後半には、ゼブラフィッシュはおるか脊椎動物において利用可能なトランスポゾンツールは存在していなかった。我々は、メダカ由来の *Tol2* 因子の研究を開始し、*Tol2* が転移酵素をコードする自律的トランスポゾンであること、脊椎動物細胞において効率よく転移すること、を明らかにし、ゼブラフィッシュにおける非常に効率の良い遺伝子導入法の開発に成功した(引用文献)。

さらに我々は、NIH グラント(2003-2007年)や基盤研究(S)(2006-2010年度)等の支援を受けて、世界に先駆けて、遺伝子トラップ法、エンハンサートラップ法、Gal4-UAS法の開発に着手し、これに成功してきた(引用文献)。これらの方法論によって、様々な細胞・器官・組織を可視化し、またそれら細胞を自由自在に操作することが可能になった。

我々はこれら独自に開発した方法論を用いて、基盤研究(A)(2011-2014年度)の支援を受け、遺伝子トラップ・エンハンサートラップスクリーンを継続して行ない、過去10年間に Gal4 をさまざまな細胞・組織・器官に特異的に発現するトランスジェニックフィッシュを合計1000系統以上作製してきた。これは現在、世界最大のトランスジェニックフィッシュリソースとなっている。我々は、そのリソースを活用するために、発現パターンとトランスポゾン挿入の部位のゲノム情報と検索機能を備えたデータベース zTrap (zebrafish gene trap and enhancer trap database, <http://kawakami.lab.nig.ac.jp/ztrap/>) を構築し、web上に公開してきた(引用文献)

我々はこれらのトランスジェニックフィッシュリソースとデータベースを基に、(1) 様々な器官形成メカニズムの研究、および(2) 新しい表現型解析システムの創出、を推進してきた。その成果として、基盤(A)(H23~H26)の研究期間内に、計47報の英文論文

(共著論文を含む)を発表してきた。このように我々の研究室は、独自性の高い方法論・トランスジェニックフィッシュシステムを基にして、世界のゼブラフィッシュ研究をリードしてきた。

2. 研究の目的

申請者のこれまでの研究をさらに発展させ、大規模にゲノムワイドな遺伝子トラップスクリーンを実施し、それに基づく網羅的な発生生物学研究、器官形成研究、神経科学研究を強力に推進するために本研究を提案するにいたった。これにより、脊椎動物の発生生物学研究、器官形成研究、神経科学研究に新展開をもたらすとともに、ゼブラフィッシュ研究の国際的研究拠点としての国立遺伝学研究所、さらには我が国の役割をさらに確固たるものにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Tol2* を用いた遺伝子トラップコンストラクトをもつプラスミド DNA を、転移酵素 mRNA とともにゼブラフィッシュ受精卵にインジェクションし、F1胚をスクリーニングすることにより、細胞・組織・器官特異的に改変型酵母転写因子 Gal4FF を発現するトランスジェニックフィッシュを同定する。かけあわせにより次世代を得て、系統として樹立する。これにより、発生生物学研究・神経科学研究・器官形成研究を展開するための基盤を構築する。3年間の研究期間内に新たに300系統樹立することを目標とし、これまでで作製してきた系統とあわせ合計1200系統からなるリソースを形成する。このようにして作製された系統については、*Tol2* 挿入部位をインバース PCR により決定し、発現パターンと遺伝子情報を有機的に結びつける。

(2) 本研究で作製されるトランスジェニックフィッシュを用いると、さまざまな細胞・組織・器官を可視化し、操作することができる。これらトランスジェニックフィッシュシステムを基にして、発生生物学研究、器官形成研究を推進し、新しい発生メカニズム、器官形成メカニズムを明らかにする。そのために、以下13名の発生生物学・器官形成研究のエキスパートを連携研究者とし、表現型解析のためのコンソーシアムを形成する:(敬称略)石谷(群馬大)、伊藤(千葉大)、稲垣(奈良先端大)、小椋(東北大)、川上(東工大)、瀬原(京大)、田村(東北大)、東島(岡崎統合バイオ)、平田(青山学院大)、日比(名古屋大)、弥益(埼玉大)、山本(名古屋大)

藤田（神奈川大）。さらに、国外の研究者との共同研究も強力に推進する。

（3）これまでに作製された、および本研究で作製されるトランスジェニックフィッシュを基にして、神経科学研究・行動遺伝学研究のための新しい研究基盤を構築する。第一に、トランスジェニックフィッシュにおける脳神経回路特異的な Gal4 発現パターンの網羅的な解析を行い、それを明らかにする。第二に、そのような Gal4 発現脳神経回路の機能を阻害し、その結果生じる行動異常を解析するシステムを構築する。第三に、そのような Gal4 発現脳神経回路の行動時における活動をリアルタイムイメージングにより解析するシステムを構築する。さらにこれらのリソース、システムを利用して、機能的脳神経回路研究を行う。

4. 研究成果

（1）*Tol2*トランスポゾン転移システムを用いた遺伝子トラップスクリーンを実施し、さまざまな細胞・組織・器官特異的にGal4FF（改良型Gal4）を発現するトランスジェニックフィッシュを新規に320系統作製した。これらの系統における、*Tol2*トランスポゾン挿入部位近傍のゲノムDNAについて、サザンブロット法、インバースPCR法による解析を行い、トランスポゾン挿入部位を決定した。それら発現情報、遺伝子情報をとりこんだデータベースの整備を行った。

（2）細胞・組織・器官特異的Gal4FF発現トランスジェニックフィッシュを活用することにより発生生物学研究、器官形成研究などの共同研究を実施した。以下に、一部を紹介する。神経細胞分化におけるニューレグリン-ErbBシグナル経路の役割の解明（発表論文²⁰）。側線神経細胞損傷後の修復過程を可視化しグリア細胞の果たす役割を解明（発表論文²²）。神経軸索の枝分かれにおけるkinesinの役割を解明（発表論文²¹）。松果体に発現する新規オプシン分子の機能を解明（発表論文²³）。糖尿病関連遺伝子FT0近傍のエンハンサー解析を行い、新規原因遺伝子を発見（発表論文²³）。モヤモヤ病原遺伝子の機能解析（発表論文²⁴）。血管内皮細胞のカルシウムイメージングに成功（発表論文²⁵）。脳脊髄液接触神経細胞の運動における役割を解明（発表論文²⁶）。筋細胞障害修復の過程で働くPax7陽性幹細胞を発見（発表論文²⁷）。ヒレ再生過程におけるfgfシグナリングの役割の解明（発表論文²⁸）。網膜における神経活動の波の発生メカニズムを解明（発表論文²⁹）。腸

管神経細胞の移動メカニズムの解明（発表論文³⁰）。嗅覚器において運動性繊毛の作り出す流れが嗅覚に重要であることを解明（発表論文³¹）。左側手綱核の視覚に依存する行動における役割を解明（発表論文³²）。E3ユビキチンリガーゼASB2が心筋細胞の成熟に重要であることを解明（発表論文³³）。ヒレ再生過程における一時的な炎症の解消の重要性を解明（発表論文³⁴）。脳血管近傍に存在し血液脳関門形成に関わる新規細胞群の発見（発表論文³⁵）。小脳顆粒細胞が恐怖条件付け学習の回復期に機能することを発見（発表論文³⁶）。脊索障害の修復の際に機能するWT1陽性新規細胞群を発見（発表論文³⁷）。これらを含めて、本研究の研究成果を英文論文40報として発表した。そのうち21報は国際共同研究の成果であり、国外の研究者との共著である。

（3）Gal4FF発現トランスジェニックフィッシュを機能的神経回路の研究に有効に活用するために、ボツリヌス毒素遺伝子を用いてGal4FF発現神経細胞の機能を効率良く阻害することができるシステムの開発に成功した（発表論文³⁸）。前視蓋および視床下部下葉の特定の脳神経回路でGal4FFを発現するトランスジェニックフィッシュを同定した。これらを利用してカルシウムイメージングを行い、エサなどの視覚刺激が食欲の中核である視床下部下葉を活性化する神経回路を発見した（発表論文³⁹）。トランスジェニックフィッシュ349系統の成体の脳を解析し、脳の様々な領域でGal4を特異的に発現する系統を77系統同定した。終脳の特定の神経細胞でGal4FFを発現するフィッシュ系統を選別して、Gal4-UAS法によりGal4FF発現神経細胞において神経毒素遺伝子を発現させ、機能阻害を行った。そのような二重トランスジェニックフィッシュの行動解析実験を行い、恐怖条件付け学習に必須な脳神経回路の同定に成功した（発表論文⁴⁰）。

<引用文献>

Identification of a functional transposase of the *Tol2* element, an *Ac*-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. Kawakami, K., Shima, A., and Kawakami, N. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97, 11403-11408 (2000).

A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. Kawakami, K., Takeda, H.,

Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N., and Mishina, M. **Developmental Cell** 7, 133-144 (2004).

Insertional mutagenesis by the *Tol2* transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryon-like*. Nagayoshi, S., Hayashi, E., Abe, G., Osato, N., Asakawa, K., Urasaki, A., Horikawa, K., Ikeo, K., Takeda, H., and Kawakami, K. **Development** 135, 159-169 (2008).

Genetic dissection of neural circuits by *Tol2* transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. Asakawa, K., Suster, M.L., Mizusawa, K., Nagayoshi, S., Kotani, T., Urasaki, A., Kishimoto, Y., Hibi, M., and Kawakami, K. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 105, 1255-1260 (2008).

zTrap: zebrafish gene trap and enhancer trap database. 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. **BMC Developmental Biology** 10(1), 105 (2010).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 40 件)

Identification of a neuronal population in the telencephalon essential for fear conditioning in zebrafish. Lal, P., Tanabe, H., Suster, M.L., Ailani, D., Kotani, Y., Muto, A., Itoh, M., Iwasaki, M., Wada, H., Yaksi, E., and Kawakami, K. **BMC Biology** 16, 45 (2018).(査読有)

Wilms Tumor 1b defines a wound-specific sheath cell subpopulation associated with notochord repair. Lopez-Baez, J.C., Simpson, D.J., Forero, L.L., Zeng, Z., Brunson, H., Salzano, A., Brombin, A., Wyatt, C., Rybski, W., Huitema, L.F.A., Dale, R.M., Kawakami, K., Englert, C., Chandra, T., Schulte-Merker, S., Hastie, N.D., and Patton, E.E. **eLife** 7, e30657 (2018). (査読有)

Transposons as tools for functional genomics in vertebrate models. Kawakami, K., Largaespada, D.A., and Ivics, Z. **Trends in Genetics** 33, 784-801 (2017). (査読有)

A novel perivascular cell population in the zebrafish brain. Galanternik, M.V., Castranova, D., Gore, A.V., Blewett, N.H.,

Jung, H.M., Stratton, A.N., Kirby, M.R., Iben, J., Miller, M.F., Kawakami, K., Maraia, R.J., and Weinstein, B.M. **eLife** 6, e24369 (2017). (査読有)

Activation of the hypothalamic feeding centre upon visual prey detection. Muto, A., Lal, P., Ailani, D., Abe, G., Itoh, M., and Kawakami, K. **Nature Communications** 8, 15029 (2017). (査読有)

Granule cells control recovery from classical conditioned fear responses in the zebrafish cerebellum. Matsuda, K., Yoshida, M., Kawakami, K., Hibi, M., and Shimizu, T. **Scientific reports** 7, 11865 (2017). (査読有)

Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 β is required for proper regeneration in zebrafish fin fold. Hasegawa, T., Hall, C.J., Crosier, P.H., Abe, G., Kawakami, K., Kudo, A., and Kawakami, A. **eLife** e22716 (2017). (査読有)

Proteolysis regulates cardiomyocyte maturation and tissue integration. Fukuda, R., Gunawan, F., Beisaw, A., Jimenez-Amilburu, V., Maischein, H.-M., Kostin, S., Kawakami, K., and Stainier, D.Y.R. **Nature Communications** 8, 14495 (2017). (査読有)

Left habenula mediates light-preference behavior in zebrafish via an asymmetrical visual pathway. Bai-bing, Z., Yao, Y.-y., Zhang, H.-f., Kawakami, K., and Du, J.-l. **Neuron** 93, 914-928 (2017). (査読有)

Motile-cilia-mediated flow improves sensitivity and temporal resolution of olfactory computations. Reiten, I., Emre Uslu, F., Fore, S., Pelgrims, R., Ringers, C., Diaz Verdugo, C., Hoffman, M., Lal, P., Kawakami, K., Pekkan, K., Yaksi, E., and Jurisch-Yaksi, N. **Current Biology** 27, 166-174 (2016). (査読有)

A novel zebrafish *ret* heterozygous model of Hirschsprung disease identifies a functional role for *mapk10* as a modifier of enteric nervous system phenotype severity. Heanue, T.A., Boesmans, W., Bell, D.M., Kawakami, K., Vanden Berghe, P., and Pachnis, V. **PLoS Genetics** 12, e1006439.(2016). (査読有)

Stereotyped initiation of retinal waves by bipolar cells via presynaptic NMDA autoreceptors. Zhang, R.-w., Li, X.-q.,

Kawakami, K., and Du, J.-I. **Nature Communications** 7, 12650 (2016). (査読有)

Optimization of a neurotoxin to investigate the contribution of excitatory interneurons to speed modulation in vivo. Sternberg, J.R., Severi, K.E., Fidelin, K., Gomez, J., Ihara, H., Alcheikh, Y., Hubbard, J. M., Kawakami, K., Suster, M., and Wyatt, C. **Current Biology** 17, 2319-2328 (2016). (査読有)

Fgf signalling controls diverse aspects of fin regeneration. Shibata, E., Yokota, Y., Horita, N., Kudo, A., Abe, G., Kawakami, K., and Kawakami, A. **Development** 143, 2920-2929 (2016). (査読有)

CSF-contacting neurons regulate locomotion by relaying mechanical stimuli to spinal circuits. Böhm, U.L., Prendergast, A., Djenoune, L., Figueiredo, S.N., Gomez, J., Stokes, C., Kaiser, S., Suster, M., Kawakami, K., Charpentier, M., Concordet, J.-P., Rio, J.-P., Del Bene, F., and Wyatt, C. **Nature Communications** 7, 10866 (2016). (査読有)

Cellular dynamics of regeneration reveals role of two distinct Pax7 stem cell populations in larval zebrafish muscle repair. Pipalia, T.G., Koth, J., Roy, S.D., Hammond, C.L., Kawakami, K., and Hughes, S.M. **Disease Models and Mechanisms** 9, 671-684 (2016). (査読有)

Endothelial Ca²⁺ oscillations reflect VEGFR signaling-regulated angiogenic capacity in vivo. Yokota, Y., Nakajima, H., Wakayama, Y., Muto, A., Kawakami, K., Fukuhara, S., and Mochizuki, N. **eLife** e08817 (2015). (査読有)

Diversification of non-visual photopigment parapinopsin in spectral sensitivity for diverse pineal functions. Koyanagi, M., Wada, S., Kawano-Yamashita, E., Hara, Y., Kuraku, S., Kosaka, S., Kawakami, K., Tamotsu, S., Tsukamoto, H., Shichida, Y., and Terakita, A. **BMC Biology** 13, 73 (2015). (査読有)

Deletion of a kinesin I motor unmasks a mechanism of homeostatic branching control by neurotrophin-3. Auer, T.O., Xiao, T., Bercier, V., Gebhardt, C., Duroure, K., Concordet, J.-P., Wyatt, C., Suster, M., Kawakami, K., Wittbrodt, J., Baier, H., and Del Bene, F. **eLife** 4, e05061 (2015). (査読

有)

Neuregulin 1 type II-ErbB signaling promotes cell divisions generating neurons from neural progenitor cells in the developing zebrafish brain. Sato, T., Sato, F., Kamezaki, A., Sakaguchi, K., Tanigome, R., Kawakami, K., and Sehara-Fujisawa, A. **PLoS One** 10, e0127360 (2015). (査読有)

⑲ Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, mysterin/RNF213. Kotani, Y., Morito, D., Yamazaki, S., Ogino, K., Kawakami, K., Takashima, S., Hirata, H., and Nagata, K. **Scientific reports** 5, 16161 (2015). (査読有)

⑳ High-resolution live imaging reveals axon-glia interactions during peripheral nerve injury and repair. Xiao, Y., Faucherre, A., Pola-Morell, L., Heddleston, J.M., Liu, T.-L., Chew, T.-L., Sato, F., Sehara-Fujisawa, A., Kawakami, K., and López-Schier, H. **Disease Models & Mechanisms** dmm.018184 (2015). (査読有)

㉑ BAC transgenic zebrafish reveal hypothalamic enhancer activity around obesity associated SNP rs9939609 within the human *FTO* gene. Rinkwitz, S., Geng, F.-S., Manning, E., Suster, M., Kawakami, K., and Becker, T.S. **Genesis** 53, 640-651 (2015). (査読有)

[学会発表](計20件)

Kawakami, K. Enhancer trapping and calcium imaging reveal a functional neuronal circuit essential for the prey capture behavior: from visual stimuli to the hypothalamic feeding center. **The 5th Zebrafish Research Conference of China**. China (2017)(招待講演)

Kawakami, K. The neuronal circuitry for prey capture in zebrafish: from visual stimuli to the hypothalamic feeding center. **The 10th Zebrafish Disease Models Conference**. USA (2017). (招待講演)

Kawakami, K. Enhancer trapping and calcium imaging reveal functional neuronal circuitries essential for fish behaviors. **2nd Malaysia Zebrafish Disease Model Workshop**. Malaysia (2017). (招待講演)

Kawakami, K. The study of amygdala and hippocampal functions in zebrafish. **FishMed2016**. Poland (2016). (招待講演)

Kawakami, K. The zebrafish amygdala and hippocampus. **7th Asia Oceania Zebrafish Meeting**. Singapore (2016). (招待講演)

Kawakami, K. The zebrafish amygdala and hippocampus. **The 9th Zebrafish Disease Models Conference**. Singapore (2016). (招待講演)

川上浩一. ゼブラフィッシュの扁桃体、海馬に相当する機能的神経回路の遺伝学的解析. **日本進化学会 第18回東京大会**. 東京 (2016). (招待講演)

Kawakami, K. The study of amygdala and hippocampal functions in zebrafish. **Imaging the Nervous System, Univ of Cambridge**. Cambridge, UK (2015). (招待講演)

川上浩一. ゼブラフィッシュ研究の最前線. **第49回日本実験動物技術者協会総会**. 静岡 (2015). (招待講演)

Kawakami, K. The study of amygdala and hippocampal functions in zebrafish. **The 8th Zebrafish Disease Models Conference**. USA (2015). (招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

Kawakami, K., Patton, E.E., Orger, M. Springer Protocols “Zebrafish: Methods and Protocols” **Methods in Molecular Biology** 1451. Humana Press. 総ページ数 : 373 ページ. (2016).

〔その他〕

zTrapデータベース :

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

ZeBrainデータベース :

<http://zebrain.nig.ac.jp/zebrain/>

6 . 研究組織

(1) 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

(2) 連携研究者

石谷 太 (ISHITANI, Tohru)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号 : 40448428

伊藤 素行 (ITOH, Motoyuki)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号 : 20377906

稲垣 直之 (INAGAKI, Naoyuki)

奈良先端大・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号 : 20223216

小椋 利彦 (OGURA, Toshihiko)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号 : 60273851

川上 厚志 (KAWAKAMI, Atsushi)
東工大・生命理工学研究科・准教授
研究者番号 : 00221896

瀬原 淳子 (SEHARA, Atsuko)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号 : 60209038

田村 宏治 (TAMURA, Koji)
東北大学・生命科学研究所・教授
研究者番号 : 70261550

東島 眞一 (HIGASHIJIMA, Shinichi)
自然科学研究機構・生命創成探求センター・教授
研究者番号 : 80270479

平田 普三 (HIRATA, Hiromi)
青山学院大学・理工学部・教授
研究者番号 : 60402450

弥益 恭 (YAMASU, Kyo)
埼玉大学・理工学研究科・教授
研究者番号 : 60230439

山本 直之 (YAMAMOTO, Naoyuki)
名古屋大学・生命農学研究科・教授
研究者番号 : 80256974

日比 正彦 (HIBI, Masahiko)
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授
研究者番号 : 40273627

藤田 深里 (FUJITA, Misato)
神奈川大学・理学部・助教
研究者番号 : 60633550