

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657055

研究課題名（和文）

Bloom遺伝子欠損メダカを用いた母性遺伝子効果変異体スクリーニング

研究課題名（英文）

Screening of maternal-effect mutants by using Bloom-deficient medaka

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：脊椎動物の初期発生においては、卵細胞に蓄積された RNA・タンパク質（母性遺伝子産物）が胚葉および体軸形成に重要な役割を演じている。Bloom 遺伝子は、DNA 修復に関与する遺伝子で RecQ helicase をコードしている。Bloom 遺伝子欠損変異細胞では、姉妹染色体交換の頻度が高くなることが知られている。本研究では、Bloom 遺伝子変異メダカを用いて胚葉・体軸形成を制御する母性遺伝子公開変異体の作製技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：During early vertebrate embryogenesis, RNAs and proteins deposited in oocytes (maternal gene products) play essential roles in formation of germ layers and body axes. Bloom gene is involved in DNA repair and encodes a RecQ helicase. In Bloom-deficient cells, the sister chromatic exchange frequently takes place. In this study, we have developed a method to make maternal-effect mutants using Bloom-deficient medaka. We show that this method can be used to identify maternal genes that control the formation of the germ layers and body axes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生遺伝・体軸形成

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の初期発生過程は、母性遺伝子産物と受精後の発生初期に発現する接合遺伝子が、協調的に機能することで制御されている。アフリカツメガエルを用いた遺伝子解析、ゼブラフィッシュ・メダカを用いた接合遺伝子変異体の単離・責任遺伝子の解析から、初期発生を制御する接合遺伝子は分かりつつあるものの、母性遺伝子産物による最初期の胚形成のメカニズムは未だ不明な部分が多い。その内、最も重要な課題が、中胚葉・内

胚葉（中内胚葉）誘導機構、胚の背腹軸形成機構、である。

これらを明らかにする方法として、ゼブラフィッシュを用いた母性遺伝子効果変異体のスクリーニングが行われ、初期胚発生の過程に異常を示す変異体が複数得られている。しかし、ホモ接合体雌成魚を育て次世代でスクリーニングする(3・4世代スクリーニング)という煩雑な手法をとっており、大規模スクリーニングが難しい、接合遺伝子変異体として致死表現型を示すものに関しては雌成魚

が得られないためスクリーニングできない等、体系的かつ網羅的なスクリーニングになっていなかった。これらの問題点を解決でき、小型魚類を用いた簡便な母性遺伝子効果変異体スクリーニング法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

Bloom (*blm*) 遺伝子は、DNA 修復異常を示すヒト Bloom 症候群の責任遺伝子であり、RecQ helicase をコードしている。*blm* 遺伝子欠損細胞では、姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange: SCE) (図 1)、および遺伝子相同組換え (homologous recombination: HR) の頻度が著しく上昇することが知られている。染色体の片方に (ヘテロ接合体) 遺伝子変異を有する *blm* 欠損細胞は、細胞分裂の過程において、高頻度に両方の染色体に変異を有する (ホモ接合体遺伝子変異) 細胞を生み出す。

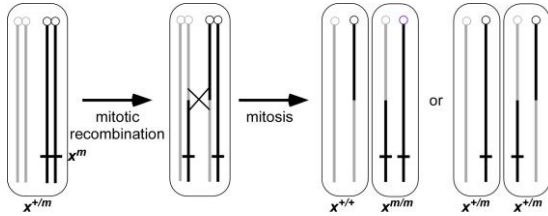


図 1 Bloom 遺伝子欠損細胞での sister chromatid exchange (姉妹染色分体交換)

一方で、ゼブラフィッシュ *blm* 遺伝子のドミナントネガティブ遺伝子 RNA をゼブラフィッシュ胚に注入し Blm タンパク質の機能を阻害することで、SCE の頻度を増加させ、ヘテロ接合体遺伝子変異体からホモ接合体遺伝子変異を持った細胞集団 (クローン) を作り得ることが証明された (Genetics 176, 1339-1342, 2007)。このことは、魚類においても、*blm* 遺伝子が SCE を抑制する働きを有しており、*blm* 欠損により SCE を誘発できることを示している。2006 年谷口らは、ENU 処理したメダカ雄魚に由来する F1 ファミリーから遺伝子シーケンス解析により、*blm* 遺伝子の機能を欠損したメダカ変異体を単離することに成功した (Genome Biol. 7, R116, 2006)。本研究では、その *blm* 変異メダカを用いて小型魚類胚発生の胚葉形成・体軸形成に異常を示す母性遺伝子効果変異体のスクリーニング法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *blm* 変異体での姉妹染色分体交換 SCE の確認

blm^{-/-} 雌魚と透明メダカ雄魚 (ST-II:i3 アルビノ変異を含む色素異常を示す三遺伝子 98, 10046-10050, 2001) を交配し、i3 アルビノ遺伝子変異と *blm* 遺伝子変異をともにヘテロ接合体で有する F1 世代 (*i3*^{+/+}; *blm*^{+/+}) を作製した。その F1 雄魚と雌魚を交配し、

i3^{+/+}; *blm*^{-/-} F2 雌魚を作製し、網膜色素細胞におけるアルビノ表現型を解析した。さらに、*i3*^{+/+}; *blm*^{-/-} 雌魚と *i3*^{+/+}; *blm*^{+/+} 雄魚を交配し *i3*^{+/+}; MZ*blm*^{-/-} (MZ: maternal-zygotic 母性接合遺伝子混合変異体) あるいは、*i3*^{+/+}; MZ*blm*^{-/-} 胚を作製し、*blm* 遺伝子が全くない状態での SCE が起こる頻度を測定した。細胞死により *i3* 変異と関係なくアルビノ表現型が生じる可能性を考え、さらに p53 の変異を導入し、細胞死の抑制された状態でのアルビノ表現型を解析した。

(2) 体軸形成に関わる遺伝子の母性遺伝子効果変異体の作製

Fgf シグナルは体の後方部 (尾部) の形成に必要であり、FGF の受容体である Fgf receptor1 の変異体 (*fgfr1*^{-/-}, headfish) は尾部形成に異常を示す。しかし、母性と接合遺伝子を失った MZ*fgfr1*^{-/-} 変異体では、尾部異常に加えて、中軸中胚葉の欠損がみられ、一つ眼の表現型を示す。*blm* 変異体と *fgfr1* 変異体を交配し、*blm*^{+/+}; *fgfr1*^{+/+} 雄魚と *blm*^{-/-}; *fgfr1*^{+/+} 雌魚を作製した。*blm*^{-/-}; *fgfr1*^{+/+} 雌魚の卵巣形成の過程で SCE が起きれば *fgfr1*^{-/-} 卵が形成されることが推測される。*blm*^{+/+}; *fgfr1*^{+/+} 雄魚と *blm*^{-/-}; *fgfr1*^{+/+} 雌魚の交配によって MZ*fgfr1*^{-/-} 変異体を得られるかどうかを解析した。

(3) 変異体遺伝型の解析

変異体遺伝子 (*blm*, *i3*, p53, *fgfr1*) の遺伝型は、変異体および野生型特異的プライマーを用いた PCR 法、または PCR で増幅した特異的 DNA 断片の RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法にて同定した。

4. 研究成果

(1) *blm* 接合遺伝子変異体では、低頻度に姉妹染色分体交換 SCE が起こる

i3^{+/+}; *blm*^{+/+} 雄魚と雌魚を交配し、図 2 に示すような網膜色素上皮がモザイク状にアルビノ (白色) になる個体を得られた (pair1:1/4670, 0.02%; pair2:0/380, 0%; pair3: 4/5259, 0.08%; pair4:1/2732, 0.04%)。



図 2 *i3*^{+/+}; *blm*^{-/-} 胚においては低頻度で網膜色素がモザイクになる個体が現れる。

この交配では、*i3*^{+/+}; *blm*^{-/-} が出現する頻度は 1/8 (12.5%) であるが、モザイクになる確率が 1-0.08% と極めて低いことから *blm* 接合遺伝子変異体では SCE が起こる確率が低いと考えられた。*blm* 遺伝子が母性因子として卵に発現しているため、*blm* 接合遺伝子変異体での SCE が抑制されている可能性が考えられた。実際、RT-PCR で検索したところ、メダ

カの卵において *blm* 遺伝子が強く発現していた (未発表データ)。

(2) *blm* 母性接合遺伝子混合変異体 (MZ*blm* 変異体) における SCE の発生

*i3^{+/+};blm^{-/-}*雌魚と *i3^{+/-};blm^{+/-}*雄魚のペア、または、*i3^{+/-};blm^{-/-}*雌魚と *i3^{+/+};blm^{+/-}*雄魚のペアを交配することにより、*i3^{+/-};MZblm^{+/-}*変異体胚の作製を行った (理論上は 25% の確率で生まれる) と、予想通り 25% に近い確率で (ペア 1: 78/330, 24%; ペア 2: 47/224, 21%) 図 3 に示すようなモザイク状の網膜を有する個体が現れた。

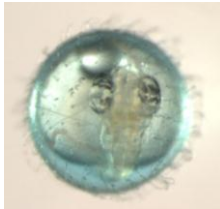


図 3 MZ*blm*^{+/-}胚は高率にモザイク状網膜となる。

しかしモザイク状の網膜有するメダカ胚の遺伝型を検索したところ、*i3* の遺伝型に関係なくモザイク網膜になると考えられた (アルビノ変異 *i3* を有しない場合でもモザイクになっていた)。 *blm^{-/-}*雌魚から生まれた胚では奇形率が高く、母性 *blm* 遺伝子が無い場合は、細胞生存率が低い可能性が考えられた。そこで、*p53* 遺伝子を欠損させることで細胞死を阻害し、*i3^{+/-};MZblm^{+/-}* を作製することでより正確に SCE の効率を高めることを考えた。*i3^{+/-};MZblm^{+/-};p53^{-/-}* 及び *i3^{+/+};MZblm^{+/-};p53^{-/-}* 胚を作製したが、*i3^{+/+}* (野生型) 場合でもモザイク網膜になる場合があることが示された。このことは、MZ*blm^{+/-}* を作製することで SCE を生じさせ、モザイク胚を作ることは可能であるが、細胞死による artifact を考慮する必要があると考えられた。*blm* 欠損による細胞死は *p53* 欠損では回避できないことから、他の細胞死抑制の手法を開発する必要が考えられた。

(3) 体軸形成に関わる遺伝子の母性遺伝子効果変異体の作製

*fgfr1^{+/-};blm^{+/-}*雄魚と *fgfr1^{+/-};blm^{-/-}*雌魚を交配し胚を得た。*fgfr1^{+/-};blm^{-/-}*雌魚は発生過程において、生殖細胞で SCE が起きることが想定され、その場合 *fgfr1^{+/-}* の卵を有する個体が現れると考えられる。その場合、交配により、尾部の欠損した *fgfr1^{+/-}* 変異体に加えて、MZ *fgfr1^{+/-}* 変異体の表現型 (尾部が欠損し、一つ眼になる) を示す胚が出現すると考えられる。10 ペアの交配から得られた胚 (3538) の内、*fgfr1^{+/-}* 接合遺伝子変異体表現型 (尾部欠損) を示した個体が 862 (24%)、そのうち MZ *fgfr1^{+/-}* 変異体の表現型 (図 4) を示した個体が 198 (5.5%, 尾部欠損を示したものの 23%) いた。このことから、*blm* メダカ変異体を用いて *fgfr1* の母性遺伝子効果変異体を作製できることが明らかとなった。

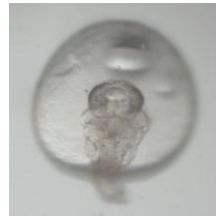


図 4 *blm* 変異体を用いて作製した MZ*fgfr1^{+/-}*胚 尾部が欠損しており、一つ眼である。

以上の結果は Bloom 遺伝子欠損メダカを用いて胚葉形成・体軸形成を制御する母性遺伝子の変異体スクリーニングを行うことができることを示している。本研究結果のデータの多くに関しては未発表であり、現在論文を作成中である。

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 12 件)

1. Hashimoto, M. and Hibi, M. (2012) Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Dev. Growth Differ.* 54, 373-389
DOI: 10.1111/j.1440-169X.2012.01348.x.
2. Kuscha, V., Fraser, S.L., Dias, T.B., Hibi, M., Becker, T., and Becker, C.G. (2012) Lesion-induced generation of interneuron cell types in specific dorso-ventral domains in the spinal cord of adult zebrafish. *J. Comp. Neurol.*
DOI:10.1002/cne.23115
3. Moriyama, Y., Kawanishi, T., Nakamura, R., Tsukahara, T., Sumiyama, K., Suster, M.L., Kawakami, K., Toyoda, A., Fujiyama, A., Yasuoka, Y., Nagao, Y.*, Sawatari, E., Shimizu, A., Wakamatsu, Y., Hibi, M., Taira, M., Okabe, M., Naruse, K., Hashimoto, H., Shimada, A., and Takeda, H. (2012) The Medaka *zic1/zic4* Mutant Provides Molecular Insights into Teleost Caudal Fin Evolution. *Curr. Biol.* 22, 601-601.
DOI:10.1016/j.cub.2012.01.063
4. Imai, H., Oomiya, Y., Kikkawa, S., Shoji, W., Hibi, M., Terashima, T., and Katsuyama, Y. (2012) Dynamic changes in the gene expression of zebrafish Reelin receptors during embryogenesis and hatching period. *Dev. Growth Differ.* 54, 253-263.
DOI: 10.1111/j.1440-169X.2012.01327.x.
5. Hibi, M. and Shimizu T. (2012) Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Dev. Neurobiol.* 72, 282-301.
DOI:10.1002/dneu.20875
6. Takano, A., Zochi, R., Hibi, M., Terashima, T., and Katsuyama, Y. (2011) Function of strawberry notch family genes in the zebrafish brain development. *Kobe. J. Med.*

- Sci. 56, E220-E230.
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/journal/contents/56/E220.pdf>
7. Tanabe, K., Kani, S., Shimizu, T., Bae, Y.-K., Abe, T., and Hibi, M. (2010) Atypical PKC regulates primary dendrite specification of cerebellar Purkinje cells by localizing Golgi apparatus. *J. Neurosci.* 30, 16983-16992.
DOI:10.1523/JNEUROSCI.3352-10.2010
 8. Nagao, Y., Cheng, J., Kamura, K., Seki, R., Maeda, A., Nihei, D., Koshida, S., Wakamatsu, Y., Fujimoto, T., Hibi, M., and Hashimoto, H. (2010) Dynein axonemal intermediate chain 2 is required for formation of the left-right body axis and kidney in medaka. *Dev. Biol.* 347, 53-61.
DOI:10.1016/j.ydbio.2010.08.001
 9. Takano, A., Zochi, R., Hibi, M., Terashima, T., and Katsuyama, Y. (2010) Expression of strawberry notch family genes during zebrafish embryogenesis. *Dev. Dyn.* 239, 1789-1796.
DOI: 10.1002/dvdy.22287
 10. Kani, S., Bae, Y.-K., Shimizu, T., Tanabe, K., Satou, C., Parsons, M.J. Scott, E., Higashijima, S.-I., and Hibi, M. (2010) Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum. *Dev. Biol.* 343, 1-17.
DOI:10.1016/j.ydbio.2010.03.024
 11. Shimizu, T., Nakazawa, M., Kani, S., Bae, Y.-K., Shimizu, T., Kageyama, R., Hibi, M. (2010) Zinc finger genes *Fezf1* and *Fezf2* control neuronal differentiation by repressing *Hes5* expression in forebrain. *Development* 137, 1875-1885.
DOI:10.1242/dev.047167
 12. Nojima, H., Rothhämel, S., Shimizu, T., Kim, C.H., Yonemura, S., Marlow, F.L., Hibi, M. (2010) Syntabulin, a motor protein linker, controls dorsal determination. *Development* 137, 923-933.
DOI:10.1242/dev.046425

[学会発表] (計 0 件)
本研究に関する学会発表は行っていない。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：