

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

Studies on vertebrate development
by the transposon-mediated Gal4 enhancer trap method

川上 浩一 (KAWAKAMI KOICHI)
国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・教授



研究の概要

モデル脊椎動物ゼブラフィッシュにおいて Gal4 エンハンサートラップ法を開発し、細胞・組織・器官で Gal4 を特異的に発現するトランスジェニックフィッシュ系統を作製する。また Gal4-UAS システムを開発し、Gal4 発現細胞の視覚化、機能改変、機能阻害を可能にする。本研究は脊椎動物遺伝子機能・ゲノム機能解析のための新しい基盤を築くものである。

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高次生命現象を遺伝学的に解析するためのモデル動物として用いられてきた。しかしながら他のモデル微生物、植物、動物では有力な解析方法である、トランスポゾンを用いた方法論が長い間未開発であった。我々は、メダカトランスポゾン *To12* が自律的なトランスポゾンであることを明らかにし、これを用いて非常に効率良くトランスジェニックフィッシュを作製できる方法を独自に開発してきた。さらには、この *To12* 転移システムを用いて遺伝子トラップ法の開発に成功してきた。

2. 研究の目的

Gal4-UAS システムは、これまでショウジョウバエの遺伝学的研究において非常に有力な手段であり続けてきた。しかしながら、モデル脊椎動物ではそのような方法論は未開発であった。本研究の目的は、*To12* 転移システムを用いてゼブラフィッシュで Gal4-UAS システムを開発し実施可能にすることである。また *To12* 挿入変異の解析から新規発生関連遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) *To12* 転移システムを用いて Gal4 エンハンサー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る。

(2) UAS リポーターフィッシュを開発し、さまざまな細胞・組織・器官での Gal4 発現を二重トランスジェニック胚での GFP 発現により視覚化する。

(3) Gal4 トランスジェニックフィッシュのゲノム解析を行い、細胞・組織・器官特異的に発現している遺伝子を同定する。

(4) Gal4 発現細胞の機能を改変あるいは阻害するための UAS エフェクターフィッシュを開発する。

(5) *To12* 挿入のホモ2倍体を作製し、*To12* 挿入が破壊している遺伝子の機能を解析する。

4. これまでの成果

(1) *To12* の転移に必要な最小領域を決定した。これにより、*To12* トランスポゾンベクターが非常にコンパクトになり使いやすくなった。*To12* を用いた遺伝子導入法は急速に国内外のゼブラフィッシュ研究者に普及し、いまや標準的なトランスジェネシス法になった。またゼブラフィッシュでの成功により、*To12* 転移システムはカエル、ニワトリ、マウスなど他の脊椎動物細胞への遺伝子導入にさかんに用いられるようになった。(発表論文5、6)

(2) *To12* 内部にヒートショックプロモーターと改変型 Gal4 (Gal4FF) をもつエンハンサートラップコンストラクトと *To12* 内部にスプライスアクセプターと Gal4FF をもつ遺伝子トラップコンストラクトを構築した。これ

らコンストラクトの挿入をゲノムにランダムにもつトランスジェニックフィッシュを Gal4 認識配列 (UAS) の下流に GFP 遺伝子をもつトランスジェニックフィッシュとかがあわせると、Gal4 発現に依存してさまざまな細胞・組織・器官での GFP 発現が見られることを示した。このようにゼブラフィッシュにおける Gal4 遺伝子トラップ・エンハンサートラップ法、Gal4-UAS 法が確立された。(発表論文 3)

(3) UAS と破傷風毒素 (TeTxLC) 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。ゼブラフィッシュの稚魚は、「触り刺激」に反応して逃避行動を示す (touch response)。UAS:TeTxLC フィッシュを Gal4 発現フィッシュとかけあわせ、二重トランスジェニック胚を得た。二重トランスジェニック胚では Gal4FF 発現細胞において TeTxLC が発現された。それら胚における touch response を解析したところ、脊髄の感覚神経で TeTxLC を発現する胚は「触り刺激」に反応しなかった。また脊髄の介在神経で TeTxLC を発現する胚は「触り刺激」に反応したが異常な逃避行動を示した。この研究により、生きている胚で神経回路を可視化しながらその機能を阻害することが可能になった。(発表論文 3)

(4) *To12* 挿入のホモ 2 倍体の解析から、体節形成に重要な新規遺伝子 *misty somites* を発見した。また、*To12* 挿入による Wnt シグナル伝達経路の転写因子 *tcf7* 遺伝子の破壊が、ヒレの形態異常を引き起こすことを明らかにした。(発表論文 4)

(5) ゼブラフィッシュゲノムへの *To12* 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。この転移酵素遺伝子と *To12* を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 *To12* は生殖細胞で効率よく転移した。この方法により *To12* 挿入の作製が容易になった。(発表論文 1)

5. 今後の計画

当初の研究目的は現時点でほぼ達成されたと考える。平成 21 年度およびそれ以降はこれまでの研究の継続と発展を目指す。

(1) Gal4 遺伝子トラップ法・Gal4 エンハンサートラップ法を実施し、さらなる遺伝子トラップ系統・エンハンサートラップ系統を樹立し解析する研究を継続す

る。

(2) Gal4 トランスジェニックフィッシュを有効に利用することができる有用な UAS エフェクターフィッシュを開発していく。

(3) 変異効率の高いコンストラクトの開発等、ゼブラフィッシュ全遺伝子ノックアウトへむけた取り組みを開始する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- (1) Efficient transposition of the *To12* transposable element from a single-copy donor in zebrafish. Urasaki, A., Asakawa, K., and **Kawakami, K.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 19827-19832, 2008.
- (2) *misty somites*, a maternal effect gene identified by transposon-mediated insertional mutagenesis in zebrafish that is essential for the somite boundary maintenance. Kotani, T., and **Kawakami, K.** Developmental Biology 316, 383-396, 2008.
- (3) Genetic dissection of neural circuits by *To12* 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.
- (4) Insertional mutagenesis by the *To12* transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn-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.
- (5) *To12*: a versatile gene transfer vector in vertebrates. Kawakami, K. Genome Biology 8 Suppl 1:S7, 2007.
- (6) Functional dissection of the *To12* transposable element identified the minimal *cis*-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. Urasaki, A., Morvan, G., and **Kawakami, K.** Genetics 174, 639-649, 2006.
- (7) データベース
zTrap: zebrafish gene trap and enhancer trap database
(<http://kawakami.lab.nig.ac.jp/zTrap/>)