

「生物の発生・分化・再生」
平成12年度採択研究代表者

岡本 仁

(理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー)

「Genetic dissectionによる神経回路網形成機構の解析」

1. 研究実施の概要

人を含めた多くの動物で全ゲノムの配列が明らかになりつつあり、そのなかにもどのような遺伝子があるかは、おおよそ予測がつく時代を迎えつつある。このような状況では、ゲノム配列から予測される遺伝子とその機能を迅速に対応つけるシステムを確立することが、研究の鍵を握るようになって考えられる。脊椎動物の全遺伝子のうちのかなりのものが脳で発現しているといわれるが、それらの中でこれまでに機能がわかっているものはむしろわずかである。申請者は、脳の神経回路網を構成する神経細胞が分化し互いに結合する過程に關与する遺伝子を系統的に同定するために、ゼブラフィッシュを用いて神経回路網(特に運動神経)の形成に異常を持つ突然変異の大規模スクリーニングを開始している。

本研究では、そのスクリーニングの結果既に得られた突然変異と、将来得られる突然変異を用いて、それらの原因遺伝子をクローニングすることを第一の目的とする。更に申請者は最近、ゼブラフィッシュ胚において、任意の遺伝子を任意の時期と場所で発現誘導できる簡便な方法を開発した。この方法を用い、遺伝子の異所性発現を行うことによって、中脳から後脳の形成に關わる遺伝子の機能解析とスクリーニングを行うことを第二の目的とする。

2. 研究実施内容

(1) ゼブラフィッシュ神経回路網突然変異の原因遺伝子の同定

我々は、前さきがけ研究研究員の東島伸一との共同研究を行い、Islet-1遺伝子の周辺100kbを探索し、後脳の運動神経細胞と感覚神経節細胞および脊髄の2次運動神経細胞での特異的発現を制御する領域と、1次感覚神経細胞での特異的発現を制御する領域を同定し、前者の発現制御領域を使って、後脳の運動神経細胞と感覚神経節細胞および脊髄の2次運動神経細胞で特異的にGFPを発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュ(Isl1-GFP)の作製に成功している。さらに、このトランスジェニック・ゼブラフィッシュに突然変異を誘発することによって、後脳の運動神経細胞の分化と軸索伸展様式に異常を持つ突然変異のスクリーニングを、開始している。ENU(ethyl nitrosourea)によって誘発された突然変異を持

つF 2 系統を年間500～600家系作製し、各系統内のかけあわせによってF3世代のホモ接合体を作製し、変異個体を同定する。1 系統のF2は、約50個の遺伝子に突然変異を持っていると考えられ、遺伝子の総数が約10万個であると考え、2000系統をスクリーニングすることが、飽和に近いスクリーニングの規模の目安となっている。今後3年間で約1500～1800系統をスクリーニングすることを目標とする。さらに、これらの突然変異のうち最も面白いもの約20～30系統について、遺伝子解析を行い、それらの原因遺伝子を同定する。平成12年度までに約100系統の突然変異を同定した。

(2) 新しい技術を用いた遺伝子の機能解析とスクリーニング

我々は最近、特定の分子がDNAとRNAに結合し、特定波長の光線を短時間照射するだけで再び遊離することを発見した。試験管内で合成されたRNAにこの分子を複数個結合させた後、1細胞期の受精卵に注入すると、このRNAからの蛋白合成は完全に抑制された。ところが発生途上の胚に、この分子の遊離に適した波長の光線を照射すると、照射を受けた部分のみでRNAの活性が回復し、RNAが翻訳されることを確認した。我々はこの技術を用いて、標識蛋白であるGFPや転写因子engrailedの発現のタイミングと場所を完全に制御できることを確認している。したがって我々は、世界で始めてケージドRNA技術の実用化に成功している。現在我々は使用する顕微鏡の光学系を改良することによって、最終的には1細胞だけで遺伝子の異所性発現を行えるように改良を加えている。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Higashijima, S., Hotta, Y., and Okamoto, H. (2000) Visualization of cranial motor neurons in live transgenic zebrafish expressing GFP under the control of the Islet-1 promoter/enhancer. *J. Neurosci.* 20 : 206-218.

Saito, T., Hascilowicz, T., Ohkido, I., Kikuchi, Y., Okamoto, H., Hayashi, S., Murakami, Y., and Matsufuji, S. (2000) Two zebrafish (*Danio rerio*) antizymes with expression and activities. *Biochem. J.* 345 : 99-106.

Masai, I., Okamoto, H., and Wilson, S. W. (2000) Midline signals regulate retinal neurogenesis in zebrafish. *Neuron*, 27 : 251-263.

Yeo, S.-Y., Little, M. H., Yamada, T., Miyashita, T., Halloran M. C, Kuwada, J. Y., Huh T.-L., Okamoto, H. (2001) Overexpression of a Slit Homologue Impairs Convergent Extension of the Mesoderm and Causes Cyclopia in Embryonic Zebrafish. *Devel. Biol.* 230 : 1-17.

岡本仁、菊池裕、瀬川浩 (2000) Islet-1ファミリーと神経系の分化

～ゼブラフィッシュを用いた神経系分化機構の研究～、蛋白質核酸酵素45(3): 233-240.

和田浩則、岡本仁 (2000) ゼブラフィッシュの突然変異体作製、脳・神経研究のための分子生物学技術講座 (小幡、井本、高田編、文光堂) pp145-154.

下田修義、岡本仁 (2000) ゼブラフィッシュにおける変異のマッピング、脳・神経研究のための分子生物学技術講座 (小幡、井本、高田編、文光堂) pp155-163.

岡本仁 (2000) 神経系の成り立ちー神経誘導とパターン形成、神経科学イラストレイテッド (森、真鍋、渡辺、岡野、宮川編、羊土社) pp92-106.

瀬川浩、岡本仁 (2000) 運動・感覚神経細胞の分化とLIM / ホメオドメイン遺伝子、pp2791-2797、小型魚類研究の新展開 蛋白質核酸酵素 12月号増刊 共立出版

和田浩則、東島眞一、岡本仁 (2000) トランスジェニックフィッシュを用いた三叉神経の軸索伸展機構の解析、pp2803-2809、蛋白質核酸酵素 12月号増刊共立出版

岡本仁、成瀬清、堀寛、武田洋幸 (2000) 小型魚類を用いた研究の可能性、pp2677-2689、小型魚類研究の新展開 蛋白質核酸酵素 12月号増刊 共立出版