

「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ると考えられる。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関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関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。

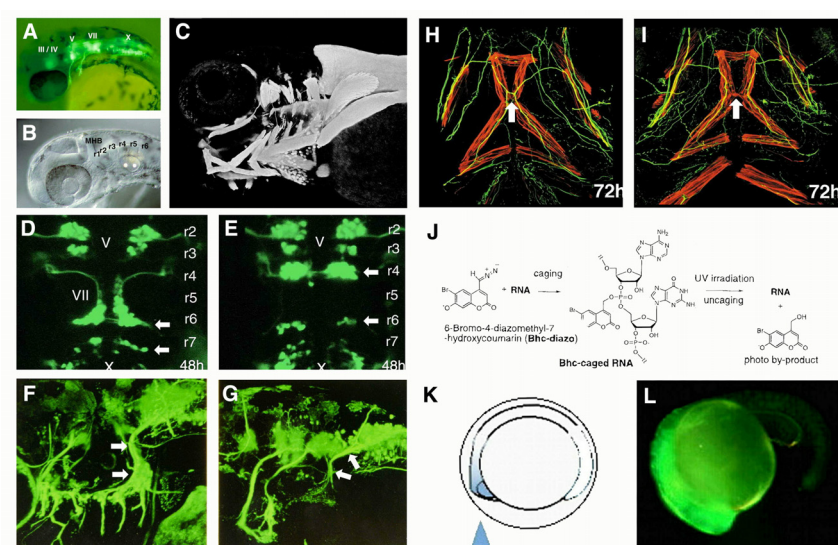
2. 研究実施内容

(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 100 kb 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 F2 系統を年間500-600家系作製し、今後3年間で約1500-1800系統をスクリーニングし、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ことをめざして、研究を進めている。

(2) caged mRNA 技術を用いた遺伝子の機能解析技術の改良

我々は、Bhc-diazo (6-bromo-4-diazomethyl-7-hydroxycoumarin) 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。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。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。



図説明

- A: 運動神経細胞特異的に発現する転写因子 Islet-1 の組織特異的エンハンサーの制御科で GFP を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュ(Islet1-GFP 系統)の胚(受精後36時間後)。III:動眼神経、IV: 滑車神経、V:三叉神経、VII:顔面神経。
- B: 受精後36時間後のゼブラフィッシュ胚の頭部。 MHB: 中脳・後脳境界領域(midbrain-hindbrain boundary)、r1~r6: 第1~6 菱脳節(rhombomere)。
- C: Islet1-GFP 系統と、 α アクチン遺伝子の組織特異的エンハンサーのもとで骨格筋で GFP を発現するトランスジェニック系統とを掛け合わせて作った2重トランスジェニック胚を、共焦点型顕微鏡で観察した三次元再構成像。
- D, E: 第4と第6菱脳節で生まれる顔面神経細胞(VII、矢印)の後方への細胞移動がおこらない突然変異胚(E)と、正常胚(D)。Islet1-GFP 系統を使った共焦点顕微鏡画像。
- F, G: 迷走神経(矢印)の軸索が腹側に伸びないで背中側に伸びている突然変異胚(G)と正常胚(F)。Islet1-GFP 系統を使った共焦点顕微鏡画像。
- H,I: 三叉神経の運動枝が正中で交叉(矢印)しない突然変異の稚魚(I)と正常な稚魚(H)。神経を FITC を結合させた抗 GFP 抗体で緑色に、顎筋群をローダミンを結合させたファロイジンで赤色に蛍光2重染色した標本を、共焦点顕微鏡で観察。
- J: Bhc-diazo (6-bromo-4-diazomethyl-7-hydroxycoumarin)を用いた mRNA のケーシング(caging)による不活化と、紫外線照射による翻訳能活性化の原理。
- K, L:受精後12時間めに頭部に紫外線を照射して(K)、頭部のみに GFP を発現させた受精後22時間目の胚(L)。

3. 研究実施体制

岡本グループ

- ① 研究担当グループ長:岡本仁(理化学研究所、チームリーダー)
- ② 研究項目
 - ・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
 - ・caged mRNA 技術を用いた遺伝子の機能解析技術の改良

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Segawa H., Miyashita T., Hirate Y., Higashijima S., Chino N., Uyemura K., Kikuchi Y. and Okamoto H. (2001) Functional repression of Islet-2 by disruption of the heteromeric complex with Ldb impairs peripheral axonal outgrowth by the primary sensory and motor neurons in embryonic zebrafish. *Neuron* 30: 423-436.
- Mizuno T., Kawasaki M., Nakahira M., Kagamiyama H., Kikuchi Y., Okamoto H., Mori K., and Yoshihara Y. (2001) Molecular diversity in zebrafish ncam family: three members with different vase usage and distinct localization. *Mol Cell Neurosci.* 18:119-30.
- Hirate, Y., Mieda, M., Harada T, Yamasu K. and Okamoto, H. (2001) Identification of *ephrin-A3* and novel genes specific to the midbrain-MHB in embryonic zebrafish by ordered differential display. *Mech. Devel.* 107: 83-96.
- Ando, H., Furuta, T., Tsien, R. Y. and Okamoto, H. (2001) Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos. *Nature Genetics*, 28: 317 - 325.
- Bingham, S., Higashijima, S., Okamoto, H., and Chandrasekhar, C. (2002) The Zebrafish trilobite Gene Is Essential for Tangential Migration of Branchiomotor Neurons. *Developmental Biology*, 242: 149 - 160.
- 岡本仁、平手良和、三枝理博、東島眞一、西脇優子、田中英臣、政井一郎、和田浩則、ゼブラフィッシュが開く脳分化・特異化機構研究の新展開ー中脳、後脳の部域特異化機構解明のための包括的アプローチー、*生体の科学* 52:216-223 (2001)
- 安藤秀樹、古田寿昭、岡本仁(2001)光で遺伝子発現を操る方法の開発ーBhc による核酸のケーシングー、*蛋白質核酸酵素* 47: 125-132.
- 岡本仁、平手良和、安藤秀樹(2002)中脳・小脳分化における相互的誘導作用の分子機構を探る。脳・神経研究のフロンティア(脳のパターン形成、神経ネットワーク、そして注目の神経再生から臨床応用まで)仲村春和、村上富士夫編、*実験医学*、20:667-675.

(2) 特許出願

なし