

「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・発生遺伝子制御研究チーム 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、それらのうち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、後脳の運動神経細胞特異的に発現するIslet-1遺伝子の発現制御領域によって、後脳の運動神経細胞と脊髄の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)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、おこなっている。ENU(ethyl nitrosourea)によって誘発された突然変異を持つF2系統のランダム交配によって、これまでに焼く1300ゲノムをスクリーニングした。以下にこれまでに同定された突然変異系統のリストをあげる。

- 1: 顔面運動神経細胞の後方への移動に異常を示す突然変異
trilobite (1 allele), *landlocked (1), traffic jam (3), 更に2系統樹立中
- 2: 三叉運動神経細胞の側方への移動に異常を示す突然変異
*freeze frame (1)
- 3: 迷走運動神経細胞の分布に異常を示す突然変異
4 系統 (そのうち2系統はマッピング済み), 更に8系統樹立中
- 4: 三叉運動神経細胞と顔面運動神経細胞の軸索伸展に異常を示す突然変異
14 系統、23 系統樹立中.
- A: 三叉運動神経細胞と顔面運動神経細胞の軸索が下顎筋に到達できない突然変異
5 系統
- B: 三叉運動神経細胞の軸索が、第1鰓丘と第2鰓丘の境界を越えて伸展できない突然変異、1 系統(2 alleles)
- C: 三叉運動神経細胞の軸索が、第1鰓丘と第2鰓丘の境界を越えた後に伸展が停止する突然変異、2 系統
- D: 三叉運動神経細胞の軸索が正中で交叉できない突然変異、4 系統(single allele), 1 系統 (2 alleles), 更に23 系統樹立中.
- E: 顔面運動神経細胞の軸索が、感覚神経の軸索束から離れられない突然変異、1 系統
- 5: 頭部感覚神経節細胞の分化に異常を示す突然変異
*ephemeral (2), *non-epibranchial (2),
- 6: 脊髄の運動神経細胞の分化や軸索走行に異常を示す突然変異、2系統 (そのうちの1系統はdeadly seven, notch1A mutantと判明)
- 7: 側線神経細胞の分化や軸索走行に異常を示す突然変異、7系統
- 8: 脳のパターン形成に異常を示す突然変異、1 系統

これらの内で5系統については、原因遺伝子の連鎖解析を詳細に行い、 ± 0.1 cM以下の範囲内にマップすることに成功し、ポジショナルクローニングを行っている。

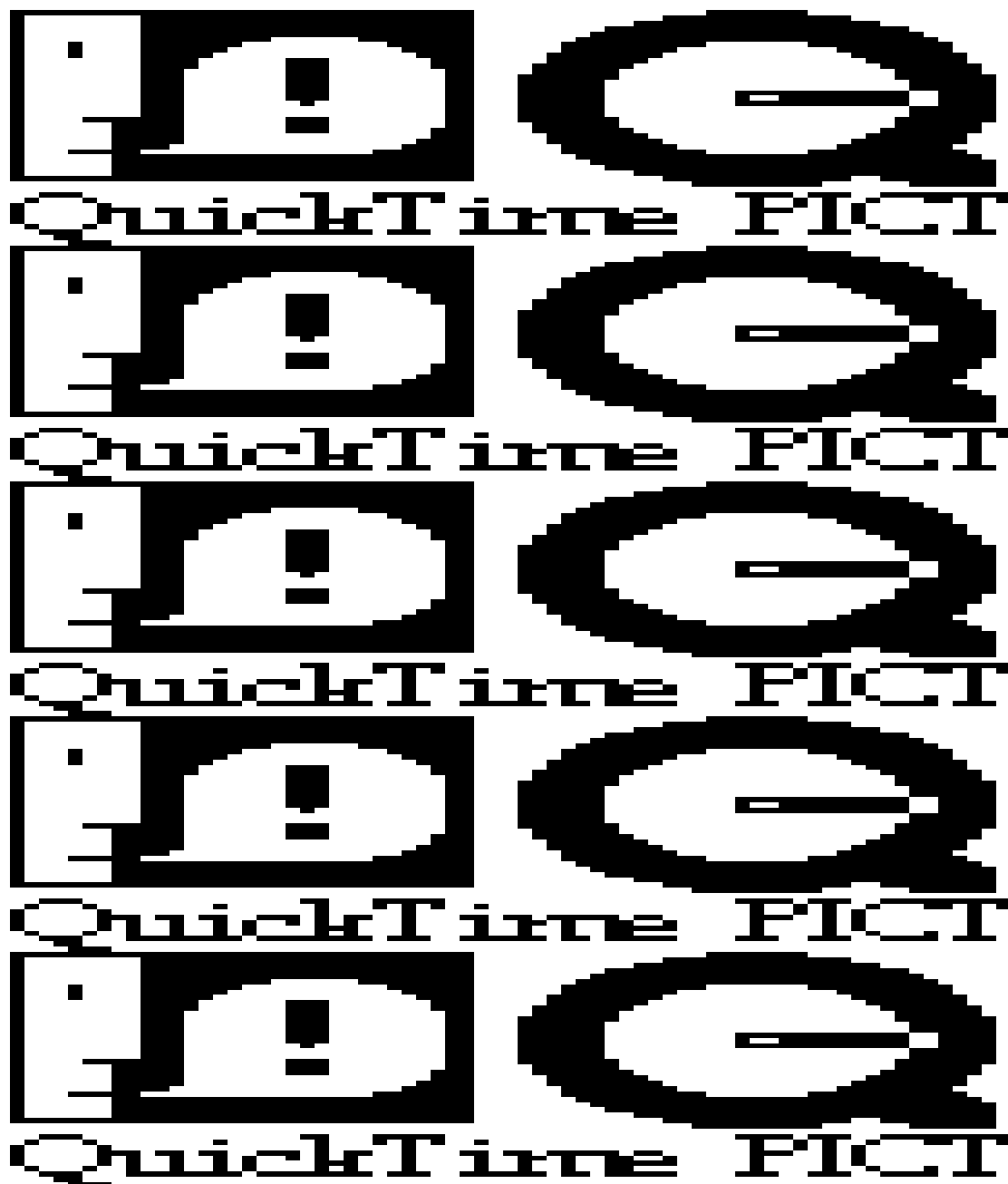
(2) 網膜分化に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体の単離と解析

今年度、約220の第2世代系統をスクリーニングして、層構造形成に異常を示す変異体を48系統同定した。さらに、これらの突然変異胚に対して網膜の切片を作製し、詳細な形態観察を行い、特異的な表現型を示す変異体10系統を選別した。

突然変異体 *pinball eye* (*piy*) は、網膜の神経細胞が細胞死を起こす変異体として同定された。ゼブラフィッシュ網膜においてHhシグナル経路を阻害した場合、幹細胞は神経細胞にならずに細胞分裂を繰り返すことが我々の研究で明らかになっている。*piy* 変異体においてHhシグナルを遮断したところ、網膜細胞は前駆細胞の状態を保ち、細胞死は抑制された。このことは、*Piy* は神経細胞に分化するときに必要な因子で、この欠損により細胞死が起きることが明らかになった。*piy* 遺伝子座を染色体上にマップしたところ23番染色体に位置することがあきらかになった。現在、*piy* 遺伝子座の近傍マーカーを探索しており、遺伝子を単離する予定である。

(3) 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1)

- A: マイクロサテライトを多型を用いて、マイクロサテライトが突然変異遺伝子座の近傍にあるかどうかを確かめる方法の模式図。
- B: RDA法 (Representational Differential Amplification) を用いて、突然変異遺伝子座の近傍の制限酵素認識部位の多型を見つける方法。
- C: 正常のIsl1-GFP胚の後脳における、後脳の運動神経細胞の分布。
- D: landlocked突然変異胚での運動神経細胞の分布。
- E: マイクロサテライトを多型とRDA法を併用してlandlocked突然変異の遺伝子座を同定する過程。

3. 研究実施体制

研究チームの構成

岡本グループ (代表: 岡本仁)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・発生遺伝子制御研究室

研究実施項目: ゼブラフィッシュ神経回路網形成機構の解析

概要: 1) 突然変異システムのスクリーニング、2) 運動・感覚神経と中枢神経の分化異常突然変異の解析、3) Caged RNA技術の改良と応用

政井グループ (代表: 政井一郎)

理化学研究所・政井独立主幹研究室

研究実施項目: ゼブラフィッシュ網膜形成異常突然変異の解析

概要: 岡本グループと共同で突然変異スクリーニングを行い、そのうちで網膜形成異常突然変異の解析を行う。

東海林グループ (代表: 東海林互)

東北大学加齢研究所

研究実施項目: 側線神経系の分化異常の突然変異の解析

概要: 岡本グループのスクリーニングによって単離された突然変異体のうちで、側線神経系の分化に異常を示す突然変異の解析を行う。

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文発表

なし

(2) 特許出願

平成14年度特許出願件数 1件 (累積件数2件)