

発生遺伝子制御研究チーム

Laboratory for Developmental Gene Regulation

チームリーダー 岡本 仁
OKAMOTO, Hitoshi

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は、脊椎動物の発生メカニズムを研究するための優れたモデル実験動物として注目されている。胚は、透明で比較的少数の細胞からできていること、世代時間も3か月と短いことなどの理由から、ゼブラフィッシュは細胞生物学や分子生物学における様々な研究に使われてきている。現在ゼブラフィッシュを用いて、個々の神経細胞を同定し操作を加えたり、系統的突然変異検索を行ったり、遺伝子導入技術を用いてトランスジェニック・フィッシュを作製したりすることが可能となってきた。我々は、このような最新の技術を駆使することにより、脊椎動物の脳の発生を制御する仕組みを解明することを目指して研究を行っている。我々は既に、LIM/ホメオドメイン型転写因子の Islet-1 ファミリーが、ゼブラフィッシュの脳の発生過程で、領域と細胞のレベルでの特異化において重要な役割を果たしていることを発見している。中でも Islet-3 は、各々が中脳と中脳・後脳境界部に由来する視蓋と小脳の発生を制御する。我々は Islet-3 の下流として働く分子と遺伝子の候補を同定し、それらの機能をゼブラフィッシュとマウスを用いて解析している。また、これらの新規遺伝子の機能を解析するために新たに開発した、ゼブラフィッシュ胚において外来遺伝子の発現を制御する新しい方法にさらに改良を加えている。Islet-2 は、一次感覚神経細胞の末梢枝の伸展と枝分かれを制御する。我々は Islet-2 の下流因子候補として PlexinA2 を同定し、これが Slit2/Robo を介した信号伝達系と相互作用することによって機能していることを発見した。このような逆遺伝学的アプローチと並行して、我々は古典的な遺伝学的アプローチでも研究を進めている。運動神経と標的筋群の発達と、それらの特異的結合を研究するための様々な系統のトランスジェニック・ゼブラフィッシュ (Isl1-GFP 系統) を用いて後脳からの軸索伸展に異常を持つ突然変異を同定した。

1. 脳発達における Islet-3 の役割

Islet-3 の mRNA は、受精後 15 時間から 17 時間目の間に、眼と中脳視蓋部に限局して発現し、この領域の特異化に関与すると考えられた。Islet-3 の LIM 領域を過剰発現すると、眼胞形成が阻害され、wnt1, engrailed2, pax2 といった中脳および中脳・後脳境界部に特異的に発現する遺伝子の発現が受精後 14 から 20 時間の間に消失し、結局中脳・後脳境界部の小脳原器が欠失する。(Kikuchi et al., Neuron 18, 369–382 (1997)) このような欠損は、完全長の Islet-3 を LIM 領域と同時に過剰発現させることによって修復されることから、Islet-3 の LIM 領域は、Islet-3 に特異的なドミナント・ネガティブ因子として働くことが示された。さらに、モザイク解析や中脳および中脳・後脳境界部の形成に必須の遺伝子群の発現を調べることによって、Islet-3 は眼の形

成には直接的に関与するが、中脳・後脳境界部の形成には、中脳・後脳境界部の発達を促進する中脳シグナルの発現を制御することを通じて間接的に関与することが示唆された。中脳・後脳境界部は、中脳と小脳の形成においてオーガナイザーの役割を果たすと考えられている。この領域の形成の分子機構をより深く理解するために、Islet-3 によって発現制御を受ける新規因子群の探索を行った。我々は Subtractive Hybridization 法と Ordered Differential Display 法という 2 種類の方法を用いて 2 種類の新規タンパクを同定した。

(1) ヌクレオポンジンの機能解析 (三枝, 鎌田, 青木, 岡本)

1 つは 317 個のアミノ酸から成り、アミノ末端の疎水性領域、それに続くシステインに富む領域、トロンボスポンジン I 型反復配列、核移行シグナルを持っておりヌクレオポンジンと命名された (トランスポンジンより改名) これをコードする mRNA は、受精後 12 時間目に前脳で発現が始まり、受精後 17 時間目までには、終脳の背側と中脳・後脳境界部、および zona limitans 付近の細胞に限局して発現するようになる。前脳における早期の発現と、その後の中脳における発現は、Islet-3 の LIM 領域を過剰発現することによって消失した。我々はこのタンパクの機能を明らかにするため、ヌクレオポンジンを熱ショックプロモーターの下流で過剰発現するトランスジェニック・フィッシュを作製した。更にマウス・ホモログの cDNA と遺伝子を単離し、この遺伝子が破壊されたノックアウト・マウスを作製するためのベクター作成を行っている。

(2) D121 タンパクの機能解析 (平手, 原田, 岡本)

さらに現在我々は D121 と仮に呼んでいるクローンに着目し研究を進めている。D121 の mRNA は、中脳と中脳後脳境界部においては、engrailed 遺伝子の mRNA と殆ど一致するパターンで発現する。ところが Engrailed タンパクが転写因子であるのに対して、D121 遺伝子は II 型の膜タンパクをコードしていると推定される。コンピュータ・プログラムによる予測では、D121 がコードするタンパクは切断され、細胞外に分泌されると推定される。我々はこのタンパクの機能を明らかにするため、D121 を熱ショックプロモーターの下流で過剰発現するトランスジェニック・フィッシュを作製した。更にマウス・ホモログの cDNA と遺伝子を単離し、この遺伝子が破壊されたノックアウト・マウスを作製するためのベクター作成を行っている。

2. 新しい遺伝子発現制御技術の改良 (安藤, 岡本)

発現制御を 1 細胞のレベルで行えるように改良を加えた。

3. Slit の役割の解析 (Yeo, 岡本)

神経細胞の成長円錐は、標的細胞に到達するまでに周囲

の様々な手がかりを参照しながら伸展方向を修正する。中枢神経系の正中部は Slit や Netrin といった様々な因子を放出し、軸索交差を制御している。Slit の多様な機能を明らかにするために、我々は Slit2 と GFP の融合タンパクを熱ショックタンパクのプロモーターのもとで過剰発現できるトランスジェニック・ゼブラフィッシュを作製した。これを用いた研究の結果、Slit2 がいくつかの種類の軸索に対して反発的に作用する一方で、感覚神経の末梢枝の伸展と枝分かれを促進していることが示された。Slit2 は N 末端と C 末端に分解されるが、交叉神経が正中を越える際に、N 末端が床板細胞から交叉神経の軸索に転移された。さらに Slit2 を介する信号伝達系には、Islet-2 の下流因子が関与していることを示した。このような軸索伸展制御に関与する一方で、Slit2 は原腸陥入における収束的伸展運動 (convergent extension movement) の制御に関与していることが明らかになった。

4. 三叉神経の運動枝と感覚枝の軸索伸展経路の決定機構の解析

正常胚では三叉神経の感覚神経細胞は双極性で、中枢側の軸索は互いに束ねられて中枢に投射するのに対して、末梢側の軸索は枝分かれを繰り返しながら末梢の皮下に広がる。Rohon-Beard 神経細胞は 3 極性で、2 本の軸索は脊髄の背中側を上行または下行し、もう一本が枝分かれを繰り返して末梢の皮下に広がる。Islet-2 の機能が抑制された胚では、三叉神経細胞と Rohon-Beard 神経細胞の両方で、末梢枝のみが選択的に失われる。我々はこの現象の分子機構を研究している。

(1) 三叉神経における感覚枝と運動枝の相互作用 (和田, 田中, 政井, 西脇, 下田, 小森, 岡本)

我々は Islet-1-GFP トランスジェニック・フィッシュを用いて、三叉神経運動枝の軸索が、感覚枝の軸索束に沿って伸展することを発見した。遠心性の運動枝に対して求心性の感覚枝がガイドレールとして働く可能性を検討するために、我々は、三叉神経感覚細胞が後脳に向かって軸索を伸展し始める前に、それらの細胞をレーザー照射し、除去された初期の三叉神経細胞の求心性の軸索は、遠心性運動神経軸索と、あとで補充される感覚神経細胞の求心性軸索の両方にたいしてガイドレールの役割を果たしていることを示した。神経冠細胞の移動が異常な突然変異系統でも、三叉運動神経の後脳外への軸索伸展が侵されないことから、プラコード由来の感覚神経細胞の軸索がガイドレールとして重要であることを示した。最近我々は、後脳運動神経の全てが、後脳から伸び出ることができなくなる突然変異を発見した。この突然変異を解析することによって、後脳運動神経軸索伸展の機構を更に深めることができると期待している。

(2) Islet-1 遺伝子のエンハンサーとプロモーターの解析 (植村, 岡本)

Islet-1 遺伝子の発現制御機構の理解は Islet-1 を発現する神経細胞の分化機構の理解に役立つと考えられる。我々は、ゼブラフィッシュ Islet-1 遺伝子を含む 100 kb の領域を解析し、後脳運動神経細胞、一次感覚神経細胞、孵化腺での発現を制御する領域を同定した。これらの領域をさらに絞っていくことによって、Islet-1 遺伝子のプロモーターは、

転写開始部より 180 bp の領域に存在し、熱ショックタンパクのプロモーターによって代用できること、運動神経細胞と感覚神経細胞での発現を制御するエンハンサー領域は転写開始部より各々 10 kb と 55 kb 下流の 600 bp と 500 bp の領域に存在すること、孵化腺での発現を制御するエンハンサー領域は上流 1~2 kb の領域に存在することを見いだした。我々はこの領域を更に絞り、最終的にはこれらの部位に結合する因子の同定を目指している。

5. 脳発生に欠陥をもつ突然変異系統のスクリーニング (和田, 田中, 政井, 西脇, 下田, 小森, 岡本)

我々は現在、Islet-1-GFP 系統を用いてミュータント・スクリーニングを行っている。現在年間 500~600 系統の F2 ファミリーのスクリーニングをするために規模を拡大している。

6. ゼブラフィッシュ網膜における神経細胞分化の波の形成機構 (政井, 岡本)

脊椎動物の網膜では、神経細胞分化は局所的に始まり、波が伝搬するように全体へ向かって広がっていく現象が知られている。しかし、現在その分子メカニズムは全く不明である。我々は、ゼブラフィッシュの網膜において、神経細胞分化は鼻側から始まり、背側そして耳側へ向けて、広がっていくことを見いだした。我々が単離したゼブラフィッシュ *ath5* 遺伝子はショウジョウバエ *atonal* 相同遺伝子で、網膜で新たにつくられた神経細胞で発現する。神経細胞分化の始まる鼻側に隣接する眼柄領域と神経網膜の境界面を物理的に除去すると、*ath5* の鼻側での発現は起こらず、耳側へ眼柄を移植すると異所的に *ath5* の発現を誘導する。このことから、鼻側での神経細胞の開始は、隣接する眼柄からのシグナルによって、担われている可能性が示唆された。ショウジョウバエの眼では、Hedgehog (Hh) のシグナル経路によって、神経細胞分化の伝搬が担われていることが明らかになっている。我々は、ゼブラフィッシュ網膜において、Hh シグナル経路を遮断した場合、細胞分化の鼻側での開始は起こるが、耳側での伝搬は完全にブロックすることを見いだした。このことは、鼻側での開始と耳側への伝搬は異なる機構で制御されていること、そして伝搬は Hh の活性に依存することを示している。

誌 上 発 表 Publications

(原著論文) * 印は査読制度がある論文誌

Kawakami K., Amsterdam A., Shimoda N., Becker T., Mugg J., Shima A., and Hopkins N.: "Proviral insertions in the zebrafish *hagoromo* gene, encoding an F-box/WD40-repeat protein, cause stripe pattern anomalies", *Curr. Biol.* **10**, 463-466 (2000). *

Yeo S.-Y., Little M. H., Yamada T., Miyashita T., Halloran M. C., Kuwada J. Y., Huh T.-L., and Okamoto H.: "Overexpression of a slit homologue impairs convergent extension of the mesoderm and causes cyclopia in embryonic zebrafish", *Dev. Biol.* **230**, 1-17 (2001). *

Naruse K., Fukamachi S., Mitani H., Kondo M., Matsuoka T., Kondo S., Hanamura N., Morita Y., Hasegawa K., Nishigaki R., Shimada A., Wada H., Kusakabe T., Suzuki N., Kinoshita M., Kanamori A., Terado T.,

Kimura H., Nonaka M., and Shima A.: "A detailed linkage map of medaka, *Oryzias latipes*: Comparative genomics and genome evolution", *Genetics* **154**, 1773–1784 (2000). *

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

政井一郎: "ゼブラフィッシュ網膜における神経細胞分化の開始および伝搬機構", *蛋白質 核酸 酵素 増刊号* **45**, 2782–2790 (2000). *

瀬川浩, 岡本仁: "運動・感覚神経細胞の分化と LIM/ホメオドメイン遺伝子", *蛋白質 核酸 酵素 増刊号* **45**, 2791–2797 (2000). *

和田浩則, 東島眞一, 岡本仁: "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", *蛋白質 核酸 酵素 増刊号* **45**, 2803–2809 (2000). *

安藤秀樹, 三品昌美: "ゼブラフィッシュのミュータジェネシス", *蛋白質 核酸 酵素 増刊号* **45**, 2829–2837 (2000). *

下田修義: "ゼブラフィッシュの遺伝子マッピング", *蛋白質 核酸 酵素 増刊号* **45**, 2838–2843 (2000). *

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Wada H., Higashijima S., and Okamoto H.: "Early-born sensory neurons act as pioneers in axonal pathfinding by both efferent and afferent components of the trigeminal nerves", 2000 Meet. on Zebrafish Development & Genetics, (Cold Spring Harbor Laboratory), New York, USA, Apr. (2000).

Masai I., Wilson S. W., and Okamoto H.: "Mechanisms underlying induction and progression of a neurogenic wave in the developing zebrafish retina", 2000 Meet. on Zebrafish Development & Genetics, (Cold Spring Harbor Laboratory), New York, USA, Apr. (2000).

Yeo S.-Y., Yamada T., Little M. H., Kuwada J. Y., and Okamoto H.: "Slit affects axonal pathfinding by the hindbrain commissural neurons in zebrafish", 2000 Meet. on Zebrafish Development & Genetics, (Cold Spring Harbor Laboratory), New York, USA, Apr. (2000).

Okamoto H., Mieda M., Hirate Y., Harada T., and Segawa H.: "Systematic screening of the factors regulating development of the midbrain/hindbrain boundary", 2000 Meet. on Zebrafish Development & Genetics, (Cold Spring Harbor Laboratory), New York, USA, Apr. (2000).

Mieda M., Hirate Y., and Okamoto H.: "Transpondin, a novel nuclear factor expressed in the forebrain and the midbrain/hindbrain boundary", 2000 Meet. on Zebrafish Development & Genetics, (Cold Spring Harbor Laboratory), New York, USA, Apr. (2000).

Bingham S., Okamoto H., and Chandrasekhar A.: "Analysis of tangential neural migration in the hindbrain of the zebrafish embryo", 2000 Meet. on Axon Guidance & Neural Plasticity, (Cold Spring Harbor Laboratory),

New York, USA, Sept. (2000).

Yeo S.-Y., Yamada T., Little M. H., Kuwada J. Y., and Okamoto H.: "Ubiquitous overexpression of slit affects axonal pathfinding by the commissural and sensory neurons in zebrafish", 2000 Meet. on Axon Guidance & Neural Plasticity, (Cold Spring Harbor Laboratory), New York, USA, Sept. (2000).

(国内会議)

植村修, 東島眞一, 千野直一, 岡本仁: "Zebrafish Phox2 遺伝子ホモログの単離と機能解析", 第 77 回日本生理学会大会, 横浜, 3 月 (2000).

瀬川浩, 菊池裕, 東島眞一, 千野直一, 植村慶一, 岡本仁: "神経発生における LIM domain binding protein-1 (Ldb-1) の機能検討", 第 77 回日本生理学会大会, 横浜, 3 月 (2000).

政井一郎: "Mechanisms underlying induction and progression of a neurogenic wave in the developing zebrafish retina", *バイオロジカルシンポジウム*, (国立遺伝学研究所), 三島, 4 月 (2000).

Yeo S.-Y., Little M. H., 山田俊哉, Kuwada J. Y., 岡本仁: "Slit affects axonal pathfinding by the hindbrain commissural neurons in zebrafish", 第 33 回日本発生生物学学会大会, 高知, 5 月 (2000).

三枝理博, 平手良和, 岡本仁: "Thrombospondin type I repeat を持つ新規核内因子の解析", 第 33 回日本発生生物学学会大会, 高知, 5 月 (2000).

政井一郎, 岡本仁: "ゼブラフィッシュ網膜における神経細胞分化の開始機構", 第 33 回日本発生生物学学会大会, 高知, 5 月 (2000).

平手良和, 三枝理博, 原田多恵, 岡本仁: "中脳後脳境界特異的に発現する新規遺伝子の解析", 第 33 回日本発生生物学学会大会, 高知, 5 月 (2000).

植村修, 東島眞一, 千野直一, 岡本仁: "GFP を用いたゼブラフィッシュ Islet-1 遺伝子のエンハンサー/プロモーター解析", 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 9 月 (2000).

Yeo S.-Y., Little M. H., 山田俊哉, Kuwada J. Y., 岡本仁: "トランスジェニック・ゼブラフィッシュを用いた神経軸索の正中交叉における Slit の機能解析", 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 9 月 (2000).

岡本仁, 平手良和, 三枝理博, 青木基子, 原田多恵: "Islet-3 によって制御される脳の領域特異化遺伝子群", 第 73 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2000).

三枝理博, 芳賀達也, Saffen D. W.: "コリン作動性シナプスの形成と神経選択的サイレンサー NRS", 第 73 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2000).

Yeo S.-Y., Little M. H., 山田俊哉, Kuwada J. Y., 岡本仁: "Overexpression of a slit homologue causes mesodermal migration defects and cyclopia in embryonic zebrafish", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

安藤秀樹, 古田寿昭, 岡本仁: "ケージド RNA によるゼブラフィッシュ胚でのコンディショナルな遺伝子発現制御", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

政井一郎, 岡本仁: "ゼブラフィッシュ網膜における神経細

胞分化の波の形成機構”, 第 23 回日本分子生物学会年会,
神戸, 12 月 (2000).

Dr. Hiroshi SEGAWA
Dr. Tomoyuki KAMATA
Dr. Hironori WADA
Dr. Yuko NISHIWAKI

*Research Subjects and Members of Laboratory
for Developmental Gene Regulation*

1. -(1) Study of Nucleopondin
-(2) Study of D121
2. Development of a Novel Technology to Induce Expression of Any Gene by Photo-Illumination
3. Functional Analysis of Slit2
4. -(1) The Guidance of the Motor Axons by the Sensory Neurons in the Trigeminal Nerve in Zebrafish
-(2) Analysis of Zebrafish Islet-1 Enhancer and Promoter Using GFP
5. Screening for Mutants with Defective Brain Development
6. Regulation of a Neurogenic Wave in the Zebrafish Developing Retina

Laboratory Head

Dr. Hitoshi OKAMOTO

Research Scientists

Dr. Hideki ANDO
Dr. Michihiro MIEDA

Technical Staffs

Ms. Atsuko KOMORI
Ms. Tae HARADA
Ms. Motoko AOKI
Mr. Sang-Yeob YEO

Assistants

Ms. Atsuko SHIMADA

Junior Research Associates

Mr. Toshio MIYASHITA
Mr. Yoshikazu HIRATE
Mr. Hideomi TANAKA

Trainees

Mr. Ryuki HANAOKA
Dr. Osamu UEMURA
Dr. Hidenori AIZAWA

Visiting Members

Dr. Ichiro MASAI
Dr. Nobuyoshi SHIMODA