

連載講座

ヒトを知るモデル動物としてのゼブラフィッシュ-2

トランスポゾンを用いた
ゼブラフィッシュの遺伝学
遺伝子トラップ法～Gal4-UAS 法

川上 浩一

Key words : トランスポゾン, 遺伝子トラップ法, Gal4-UAS 法

遺伝子やエンハンサーの機能解析, あるいは胚が透明であるという長所を活かした細胞の蛍光ラベル実験において, トランスジェニックゼブラフィッシュの作製は重要である。Stuart らは, 受精卵の細胞質へのプラスミド DNA の微量注入によりトランスジェニックフィッシュの作製が可能であることを示した¹⁾。その方法を用いて, Long らによる GATA-1 プロモーターの下流に GFP 遺伝子を組み込んだトランスジェニックフィッシュの作製²⁾, 東島らによるアクチンプロモーターの下流に GFP 遺伝子を組み込んだトランスジェニックフィッシュの作製³⁾などの研究が行われた。しかしながら, 1990年代後半プラスミド DNA の微量注入によるトランスジェニックフィッシュの作製効率はとても低いものであった。ショウジョウバエにおける P 因子のようなトランスポゾンを用いた遺伝学的方法論がゼブラフィッシュにおいて開発されれば, その問題が克服され, 研究が飛躍的に進むことは明らかであったが, そのような方法論は未開発であった。その理由は, 当時脊椎動物において効率よく転移するトランスポゾンが見つかっていなかったことにあった。

I トランスポゾンを用いたトランスジェニックフィッシュの作製

1996 年, メダカゲノムからトランスポゾンが発見され *Tol2* と名付けられた⁴⁾。筆者らは, *Tol2*

が活性を有する転移酵素をコードすること, およびゼブラフィッシュ生殖細胞系譜において非常に効率よく転移することを明らかにした^{5,6)}。これらの研究により, ゼブラフィッシュにおいてトランスポゾンを用いた遺伝学的方法論の開発の道が拓かれた。

Tol2 は, *hAT* ファミリーに属する DNA 型トランスポゾンである。全長は 4,682 bp で, 内部には 640 アミノ酸から成る転移酵素をコードしている(図 1A)。筆者らは, 転移に必要なシス配列を明らかにするために, 様々なサイズの *Tol2* ベクターを構築した。その結果, *Tol2* の転移には, 転移酵素遺伝子の 5' 側の 200 bp と 3' 側の 150 bp が必要十分であることが明らかになった⁷⁾(図 1A)。この解析により *Tol2* ベクターは非常にコンパクトになり, トランスジェニックゼブラフィッシュの作製を飛躍的に促進することになった。

受精卵に DNA を微量注入で導入し, それを成魚にまで育て (F0) かけ合わせると, 次世代 (F1) に微量注入された DNA をゲノムに持つトランスジェニックフィッシュが得られる。プラスミド DNA を微量注入した場合, 注入された胚が次世代に外来 DNA を伝播する割合は 5% 程度かそれ以下であった。トランスポゾン転移システムを用いる場合は, 外来 DNA を組み込んだ *Tol2* ベクターと試験管内で合成した転移酵素 mRNA を共

Transposon-mediated genetic methods in zebrafish

Kawakami Koichi : 国立遺伝学研究所遺伝形質研究系発生遺伝学研究室 (〒 411-8540 静岡県三島市谷田 1111)

0370-9531/12/¥500/ 論文/JCOPY

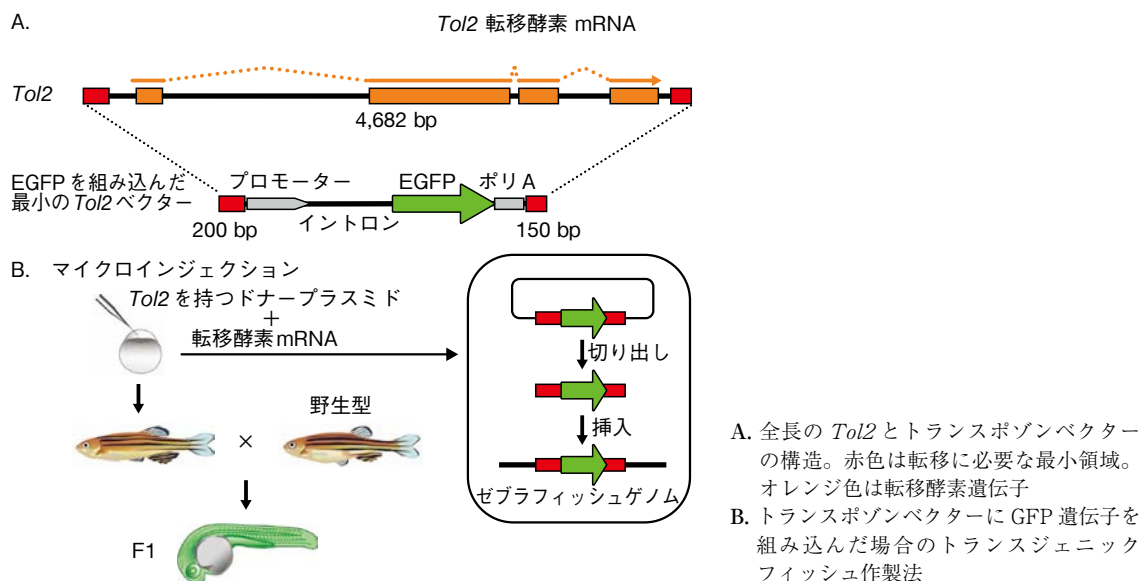


図 1 *Tol2* トランスポゾンを用いたトランスジェニックフィッシュの作製

に受精卵に微量注入する。*Tol2* ベクターはプラスミドから転移酵素活性によって切り出され、ゲノムに挿入される。この方法で、微量注入胚が founder フィッシュとなる割合は 50% 以上、ときには 100% という高効率であった (図 1B)。

Tol2 ベクターに、10 kb の大きさの外来 DNA を組み込んだ場合でも、効率よく転移した⁷⁾。更に、100 kb 以上の BAC プラスミドを組み込んだ *Tol2* コンストラクトも転移することがわかった。すなわち、BAC のような大きな DNA 断片をシングルコピーに持つトランスジェニックフィッシュの作製が容易になった⁸⁾。

トランスポゾンを用いた遺伝子導入には、一般的に、以下のような長所がある。① 高頻度でゲノムへ挿入できる。② シングルコピーで挿入できる。③ カセットとして働き、端から端まで正しく挿入できる。④ ゲノムの挿入部位近傍に、不必要な欠失や再編成を引き起こさない。⑤ ウイルスベクターを用いた方法に比べ、扱いやすさ、安全性において大きなメリットがある。*Tol2* はメダカ、ゼブラフィッシュなどの魚類だけでなく、調べた限りすべての脊椎動物 (カエル、ニワトリ、マウス、ヒト) 細胞中で転移した⁹⁾。現在、様々な生物種で遺伝子導入に用いられている。

II トランスポゾンを用いたトラップシステム

効率のよいトランスポゾン転移システムが存在すると、ゲノムへのランダムな挿入が多数作製できるため、フォワード遺伝学的アプローチが可能になる (図 2)。

1) 遺伝子トラップ法

トランスポゾンに、スプライスアクセプターと、プロモーターを持たないリポーター遺伝子 (GFP 遺伝子など)、polyA シグナルを組み込み、ゲノムにランダムに挿入させる。トランスポゾンが遺伝子内に挿入され、転写がスプライスアクセプターに流入したときにのみリポーター遺伝子が発現する。

2) エンハンサートラップ法

トランスポゾンに、最小の活性を持つプロモーターとリポーター遺伝子、polyA シグナルを組み込む。トランスポゾンがゲノムに挿入され、近傍の内在性エンハンサーで最小プロモーターが活性化されたときにリポーター遺伝子が発現する。

3) プロテイントラップ法

遺伝子トラップと同様の原理であるが、トランスポゾンに、スプライスアクセプターと ATG を持たないリポーター遺伝子を組み込んでおく。内

在性のタンパク質のコーディングフレームがリポーター遺伝子のコーディングフレームと合致したときにのみ、リポーター遺伝子が発現する。

4) polyA トラップ法 (3' エクソントラップ)

mRNA からのタンパク質の翻訳は polyA 配列がないと減弱する。この性質を利用して、トランスポゾンに、普遍的なプロモーター、リポーター遺伝子、スプライスドナーを組み込む。トランスポゾンが polyA の上流に組み込まれると、mRNA が安定化され、リポータータンパク質が効率よく翻訳される。

筆者らは、*Tol2* トランスポゾンを用いて、遺伝子トラップ法、エンハンサートラップ法の開発に成功し、多数の組織・細胞特異的に GFP を発現するトランスジェニックフィッシュを作製した^{6,10)}。実際の実験では、受精卵に遺伝子トラップコンストラクトを持つプラスミドと転移酵素 mRNA を微量注入する。そのようなゼブラフィッシュを成魚にし、かけ合わせ、次世代の胚を観察する。例えば、心臓が光る胚が得られたならば、トランスポゾンは心臓で発現する遺伝子 (近傍) に挿入されているはずであるということになる。このように、① 特定の組織・細胞を観察・研究するためのリソースの創出、② 新しい遺伝子の発見、が期待できる。

Clark らは、プロテイントラップと polyA トラップを組み合わせたコンストラクトを作製した (gene-break transposon)¹¹⁾。Trinh らは、プロテイントラップのリポーター遺伝子の終止コドンを外し、スプライスドナーをつけた。リポータータンパク質配列が内在性のタンパク質の内部に存在することになり、タンパク質の挙動が視覚化された¹²⁾。

III Gal4-UAS 法による組織・細胞の可視化と操作

遺伝子トラップ法、エンハンサートラップ法の開発によって、プロモーターをクローニングすることなしに、様々な細胞を可視化しリアルタイムで観察することが可能になった。更に、筆者らは、細胞の機能や活性を明らかにするために、Gal4-UAS 法の開発に成功した¹³⁾。

遺伝子の構造

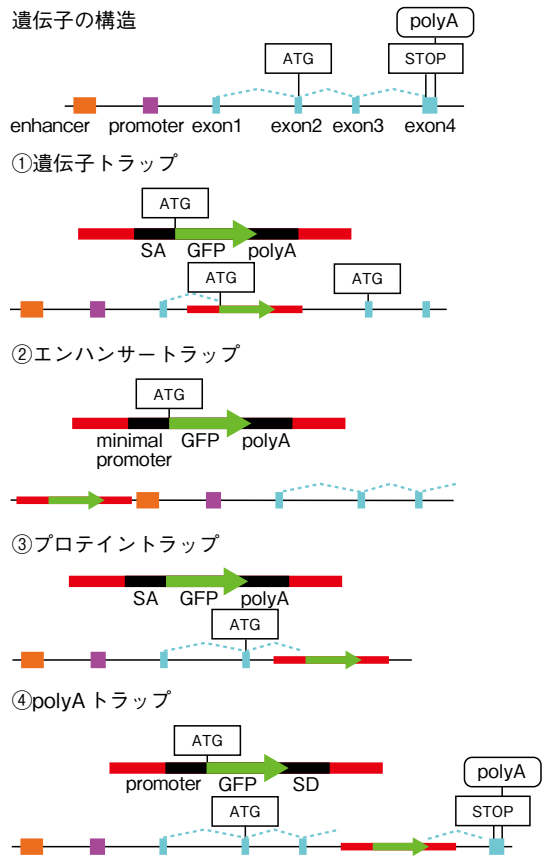


図 2 トランスポゾンを用いたフォワード遺伝学的方法論
仮想的な遺伝子 (エンハンサー、プロモーター、エクソンなど) に、①遺伝子トラップコンストラクト、②エンハンサートラップコンストラクト、③プロテイントラップコンストラクト、④polyA トラップコンストラクト、が挿入し、リポーター遺伝子が発現するメカニズムを表す。

酵母転写因子 Gal4 は、特異的な DNA 配列 (UAS) に結合して転写を活性化する。前節の遺伝子トラップコンストラクト、あるいはエンハンサートラップコンストラクトの GFP 遺伝子の代わりに、改変型 Gal4 遺伝子 (Gal4FF) を組み込んだ。これらコンストラクトを転移酵素 mRNA と共に受精卵にマイクロインジェクションすると、様々な組織・細胞・器官において Gal4 を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製できる。Gal4 の発現を視覚化するために、GFP (あるいは RFP) を UAS の下流に持つトランスジェニックフィッシュを作製し、Gal4 発現フィッシュとかけ合わせると、Gal4 発現に依存して GFP が発現される (図 3)。

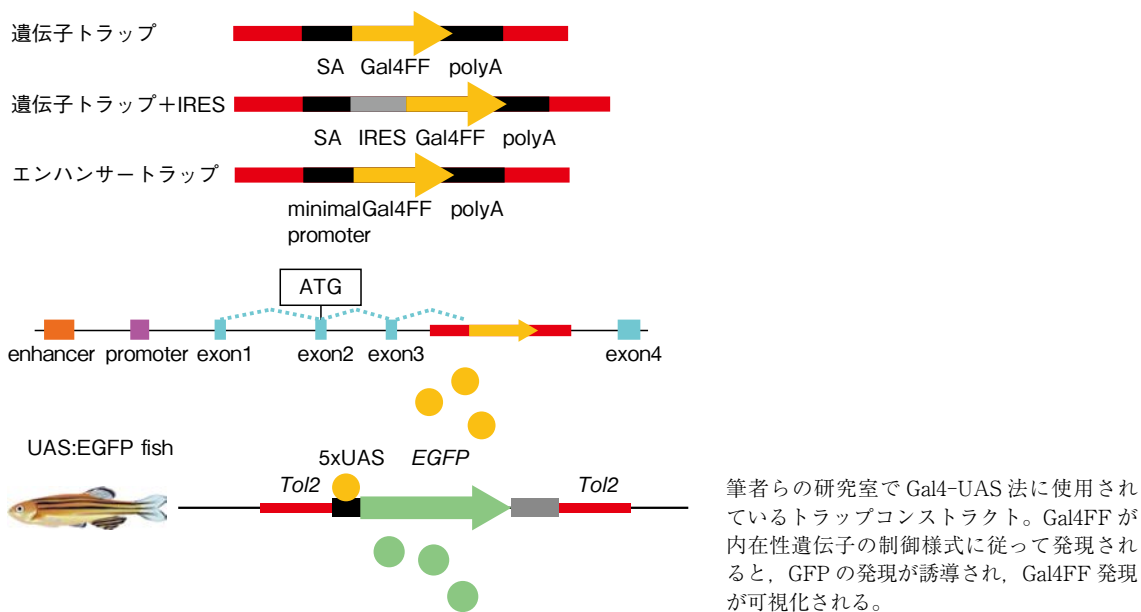


図 3 Gal4-UAS 法と組み合わせた遺伝子トラップ・エンハンサートラップ法

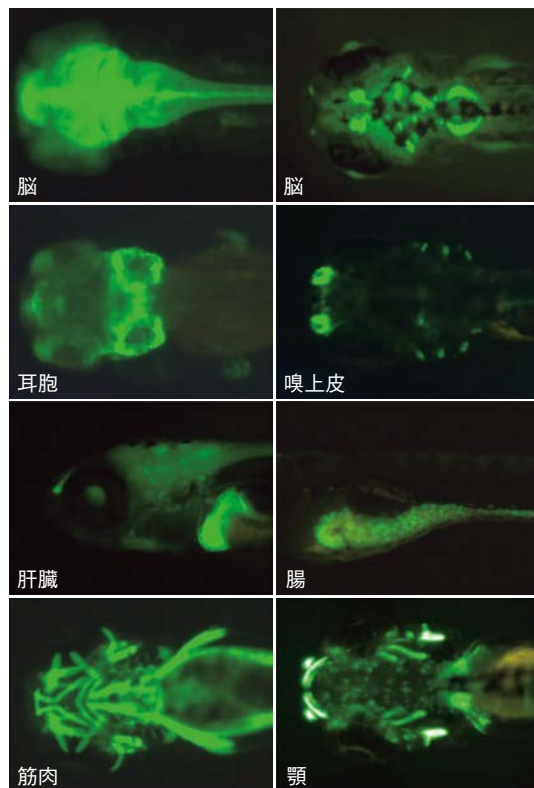


図 4 遺伝子トラップ法によって作製された様々な組織・細胞特異的 Gal4 発現フィッシュ

筆者の研究室では、大規模な遺伝子トラップスクリーンを継続して実施し、これまでに2,000系統以上のGal4を特異的に発現するトランスジェニックフィッシュを作製してきた(図4)。これは、世界最大のトランスジェニックフィッシュリソースである。筆者らは、トランスジェニックフィッシュを閲覧・検索するためのデータベースを構築し¹⁴⁾、国内外のゼブラフィッシュを用いて発生、器官形成、神経科学、ヒト疾患モデルなどを研究している多くの研究者と共同研究を展開している。

Gal4-UAS法の最大の特長は、UASの下流に任意の遺伝子(エフェクター遺伝子)を組み込むことにより、Gal4発現細胞において、エフェクター遺伝子の発現を誘導できることである。ボツリヌス毒素軽鎖(botulinum toxin light chain; BoTxLC)は、シナプス間隙への神経伝達物質の分泌を阻害することにより神経機能を阻害する¹⁵⁾。筆者らはUASの下流にBoTxLC遺伝子を組み込んだトランスジェニックフィッシュを作製し、異なる脳領域(終脳)の神経細胞でGal4を発現するトランスジェニックフィッシュとかけ合わせた。野生型のゼブラフィッシュは“光刺激”と“電気ショック”の組み合わせに対して恐怖条件付け学習を示す。終脳の背側内側部の神経細胞で

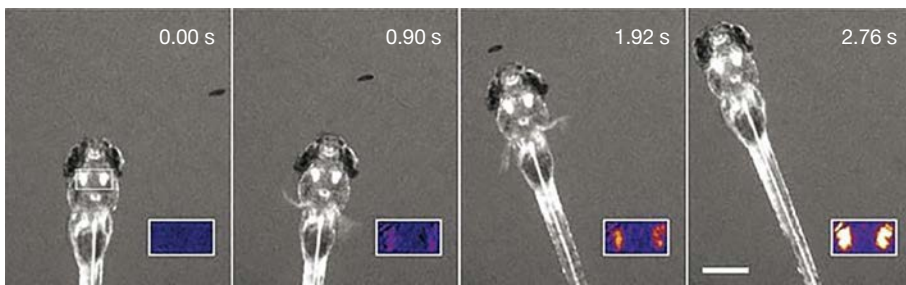


図 5 自由遊泳中のゼブラフィッシュが餌(ゾウリムシ)を認識し摂餌行動を起こす際の視床下部下葉の活動のカルシウムイメージング

Gal4 を発現する系統では、恐怖条件付け学習が低下していた¹⁶⁾。このように、特定の神経回路を機能阻害し、その神経細胞の機能を明らかにすることが可能になった。

また、筆者らは、脳神経細胞の活動を、リアルタイムで観察することにも成功してきた。GCaMP は GFP をベースにして作られ、カルシウムイオンに結合すると蛍光強度を増すカルシウムインジケータである。すなわち、GCaMP を発現している神経細胞が発火すると、細胞内にカルシウムイオンが流入し細胞内カルシウムイオン濃度が上昇、GCaMP は輝きを増す。筆者らは、UAS の下流に GCaMP 遺伝子を組み込んだトランスジェニックフィッシュを作製し、Gal4 を視蓋や視床下部の摂食中枢で発現するトランスジェニックフィッシュとかけ合わせることで、ゼブラフィッシュ仔魚が餌であるゾウリムシに対して摂餌行動を行う際の脳神経活動のイメージングに成功した^{17,18)}(図5)。

おわりに

組織・細胞に特異的にリポーター遺伝子やエフェクター遺伝子を発現するトランスジェニックフィッシュ系統と、胚が透明であるという特長を活かしたイメージング技術は、ゼブラフィッシュ研究を推進する車の両輪である。今後も新しい顕微鏡技術、透明化技術、細胞系譜のトレーシング技術、シングルセル RNA-seq 技術などと組み合わせて、脊椎動物の細胞アトラスの全体像が明か

されていくことが期待される。

●文 献

- 1) Stuart GW, McMurray JV, Westerfield M : *Development*. **103** : 403-412, 1988
- 2) Long Q, Meng A, Wang H et al : *Development*. **124** : 4105-4111, 1997
- 3) Higashijima SI, Okamoto H, Ueno N et al : *Dev Biol*. **192** : 289-299, 1997
- 4) Koga A, Suzuki M, Inagaki H et al : *Nature*. **383** : 30, 1996
- 5) Kawakami K, Shima A, Kawakami N : *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97** : 11403-11408, 2000
- 6) Kawakami K, Takeda H, Kawakami N et al : *Dev Cell*. **7** : 133-144, 2004
- 7) Urasaki A, Morvan G, Kawakami K : *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105** : 1255-1260, 2006
- 8) Suster ML, Sumiyama K, Kawakami K : *BMC Genomics*. **10** : 477, 2009
- 9) Kawakami K : *Genome Biol*. **8** : S7, 2007
- 10) Nagayoshi S, Hayashi E, Abe G et al : *Development*. **135** : 159-169, 2008
- 11) Clark KJ, Balciunas D, Pogoda HM et al : *Nat Methods*. **8** : 506-515, 2011
- 12) Trinh le A, Hochgreb T, Graham M et al : *Genes Dev*. **25** : 2306-2320, 2011
- 13) Asakawa K, Suster ML, Mizusawa K et al : *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105** : 1255-1260, 2008
- 14) Kawakami K, Abe G, Asada T et al : *BMC Dev Biol*. **10** : 105, 2010
- 15) Sternberg JR, Severi KE, Fidelin K et al : *Curr Biol*. **26** : 2319-2328, 2016
- 16) Lal P, Tanabe H, Suster ML et al : *BMC Biol*. **16** : 45, 2018
- 17) Muto A, Ohkura M, Abe G et al : *Curr Biol*. **23** : 307-311, 2013
- 18) Muto A, Lal P, Ailani D et al : *Nat Commun*. **8** : 15029, 2017