

メダカの組織学的解析と遺伝学的解析

井上慎子

教育・研究技術支援室 生物・生体技術系

概要

生物機能開発利用研究センターの動物器官機能研究分野ではゼブラフィッシュとメダカを用いて受精卵から複雑な構造と機能を有する器官が発生するメカニズムを研究している。小脳の主要な機能は知覚と運動機能の統合であり、小脳が損傷を受けると円滑な運動や平衡感覚に依存した運動に異常をきたす。また近年、小脳は認識・感情・学習などの高度な神経活動にも関与すると考えられており、小脳機能異常と自閉症等の精神疾患の関連も示唆されている。名古屋大学の故富田英夫博士により自然発生変異株として単離されたメダカ変異体 *ro* は、25°C以上の水温で飼うと真っ直ぐに泳げず回転する。この表現型はヒトの小脳異常に付随した失調症状に類似しており、*ro* 変異体を解析することで脊椎動物に共通した小脳神経回路の形成・機能の解析が可能であると考えられた。私は、*ro* 変異体の責任遺伝子のポジショナルクローニングを行うとともに、*ro* 変異体の中枢神経の組織切片作製を行った。さらに、名古屋大学で単離された *Toll1*・*Toll2* トランスポゾンを用いたジーン・エンハンサートラップを行っており、様々な細胞・組織・器官で任意のタンパク質を発現することが可能なトランスジェニックフィッシュの作製を行っている。それぞれの実験に関して、これまで得られた実験結果を紹介したい。

1 メダカ行動変異体 *ro* の遺伝学的解析

1.1 *ro* 変異体責任遺伝子のポジショナルクローニング

原因遺伝子の同定にはメダカの遺伝的多様性を利用する。*ro* 変異体（南日本集団）と *HNI/Kaga*（北日本集団）を交配し、F2 で運動失調症状を示す個体を得る。F2 で運動失調を示す個体は野生型と *ro* 由来の染色体がモザイク状になっているが原因遺伝子については必ず *ro* 系統になっている。またその近傍領域も遺伝的に連鎖しているため *ro* 由来（南日本集団由来）である確率が高い。この原理に基づいて責任遺伝子を探した。

F2 個体を、運動失調症状を示す個体と示さない個体に選別し（表 1）、ゲノム DNA を得る。30 個体分を等量混合した DNA について M-MAKER（各連鎖群に 2 マーカー、Simple Sequence Length Polymorphism: SSLP マーカー）を用いて PCR を行い PCR 産物の電気泳動パターンを比較し責任遺伝子を連鎖群 23 のテロメア近傍にマッピングした（図 1）。さらに、この領域における南日本集団と北日本集団のゲノム配列の違いを検索し、新たな PCR ベースの多型マーカーである SSLP および RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) マーカーをデザインした。表現型ありの個体のゲノム DNA について、各マーカーが *ro* 由来か野生型由来か調べ（マーカーが原因遺伝子に近いほど *ro* 由来のパターンを示す確率が高くなる）遺伝子の領域をさらに絞った（図 2A）。遺伝子情報(Ensemble)をもとにこの領域にある候補遺伝子を調べ、野生型および *ro* 変異体の脳での発現を検索したところ、*contactin1b* の発現が減少していることを見出した。野生型および *ro* 変異体から *contactin1b* の cDNA を単離しシーケンス解析を行ったところ、タンパク質コード領域に欠失が認められた。さらに、この領域に相当する Exon 15 の領域を調べたところ、*ro* 変異体のゲノム DNA で 23 bp の欠失を確認できた（図 2B）。Contactin1b は、6 個の免疫グロブリンスーパーファミリー(Ig)ドメイン、4 個の III 型フィブロネクチン(FNIII)ドメイン、GPI アンカーから構成される膜タンパク質で、脳などの中枢神経系に発現し、

神経回路形成などに関与していると考えられている。*ro* 変異体では、FNIII ドメインより C 末端側が欠損したタンパク質が作られ (図 2C)、さらに nonsense-mediated RNA decay より変異型タンパク質の発現量が減少しているものと予想された。以上の結果から、*contactin1b* が *ro* 変異体の責任遺伝子である可能性が高いと考えられた。

表 1

	F2	運動失調あり	運動失調なし
<i>ro</i> × <i>kaga</i>	1112	242	870
<i>ro</i> × HNI	1202	273	929

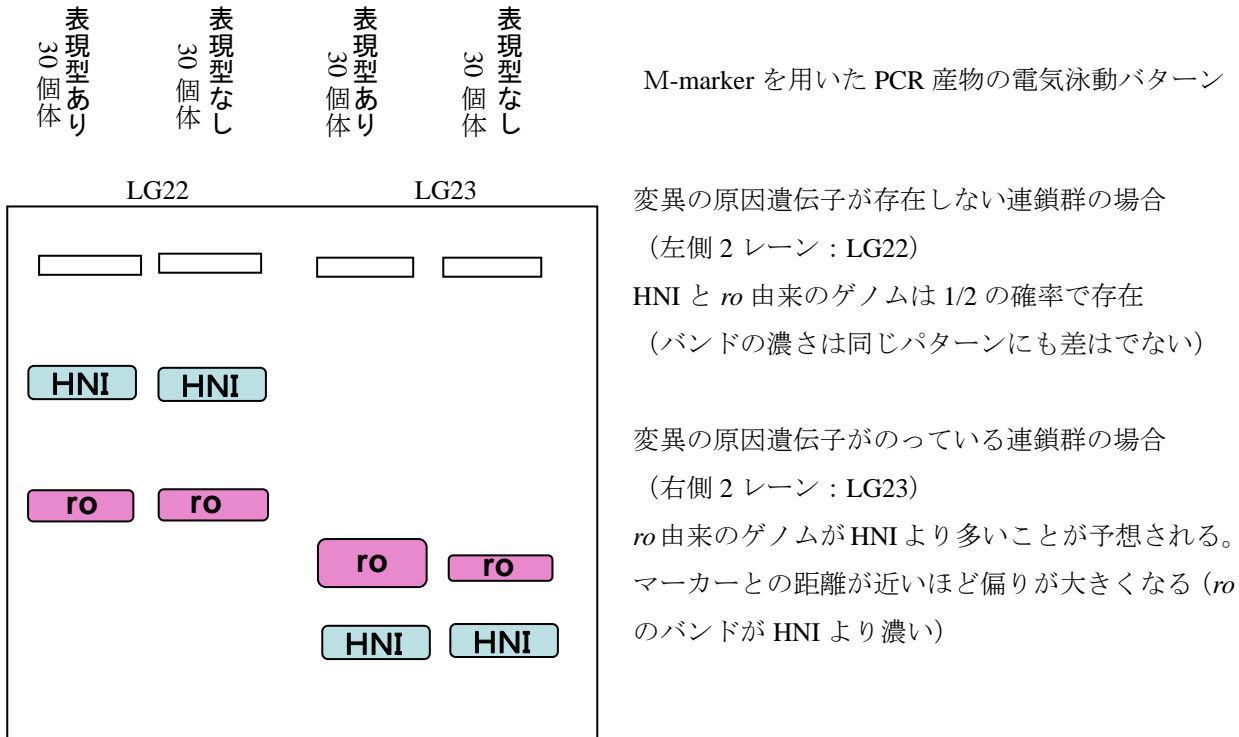


図 1 M-marker を用いた連鎖群の決定

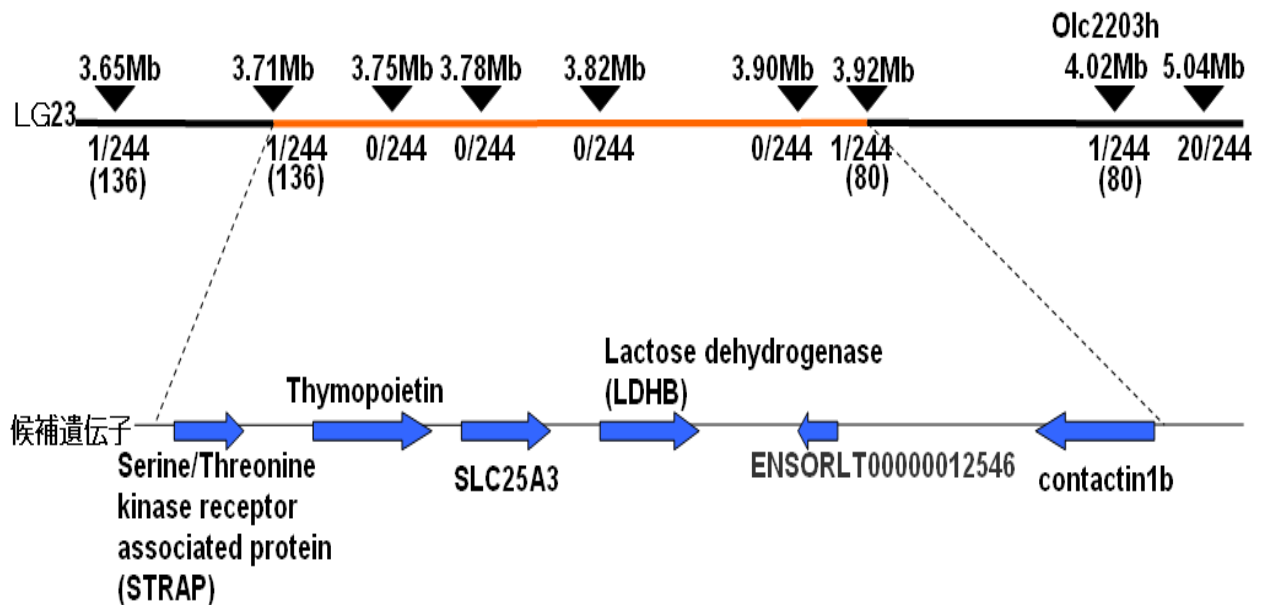


図 2 *ro* 原因遺伝子の候補遺伝子

A

```

(1) 1      10     20     30     40     50     60     70
wild-type exon15 (1) CAGGCTAACAAAGTGGGTTCACACTGTTAAAAGATTTCATAATTACCTGATCTCCAGGTGTCCCGGGCCTCC
ro exon15 (1) CAGGCTAACAAAGTGGGTTCACACTGTTAAAAGATTTCATAATTACCTGATCTCCAGGTGTCCCGGGCCTCC

(73) 73     80     90     100    110    120    130    140    154
wild-type exon15 (73) TGGTGTATCCCGGTGGAGGAGATCGGAGACACGTGGGTGAAGTTGGTGTGGACCAAGGTGCAGAGCATAATAGCCCCATT
ro exon15 (73) T-----CGGAGACACGTGGGTGAAGTTGGTGTGGACCAAGGTGCAGAGCATAATAGCCCCATT
  
```

B

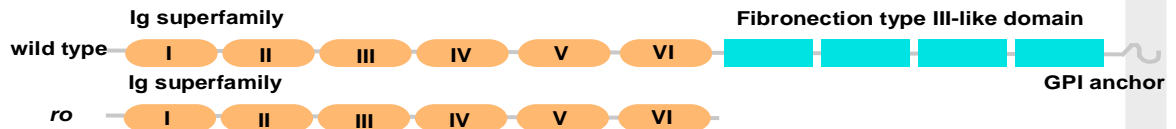


図3 A 原因遺伝子の変異部位 B コンタクチン 1b の構造

2 ro の組織学的解析

2.1 メダカの脳と小脳神経回路

小脳は、魚類から哺乳類まで構造・神経回路が保存されている。

GABA 作動性神経であるプルキンエ細胞と、グルタミン酸作動性神経の顆粒細胞は、異なる神経前駆細胞から形成され、異なる入力情報を受け取る。二つの入力情報はプルキンエ細胞で統合され小脳外へ出力されることで、行動だけでなく高次な神経活動を制御している。

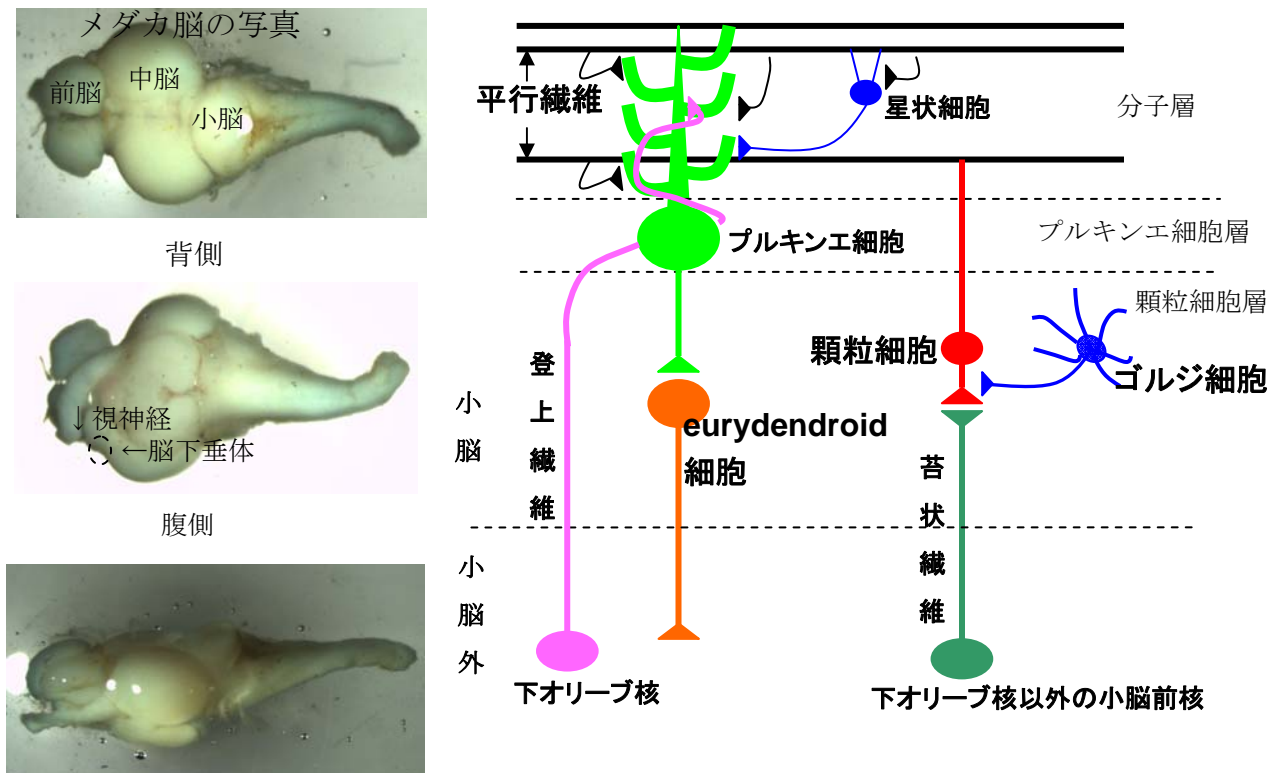


図4 メダカ脳と小脳神経回路

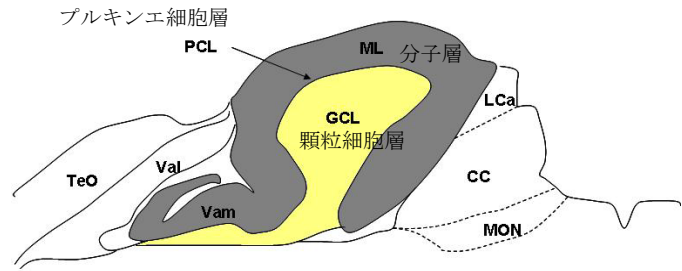
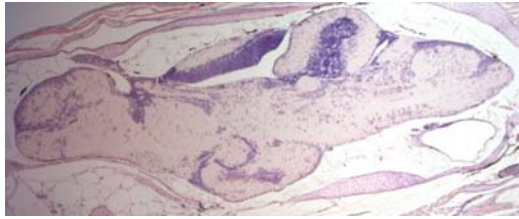
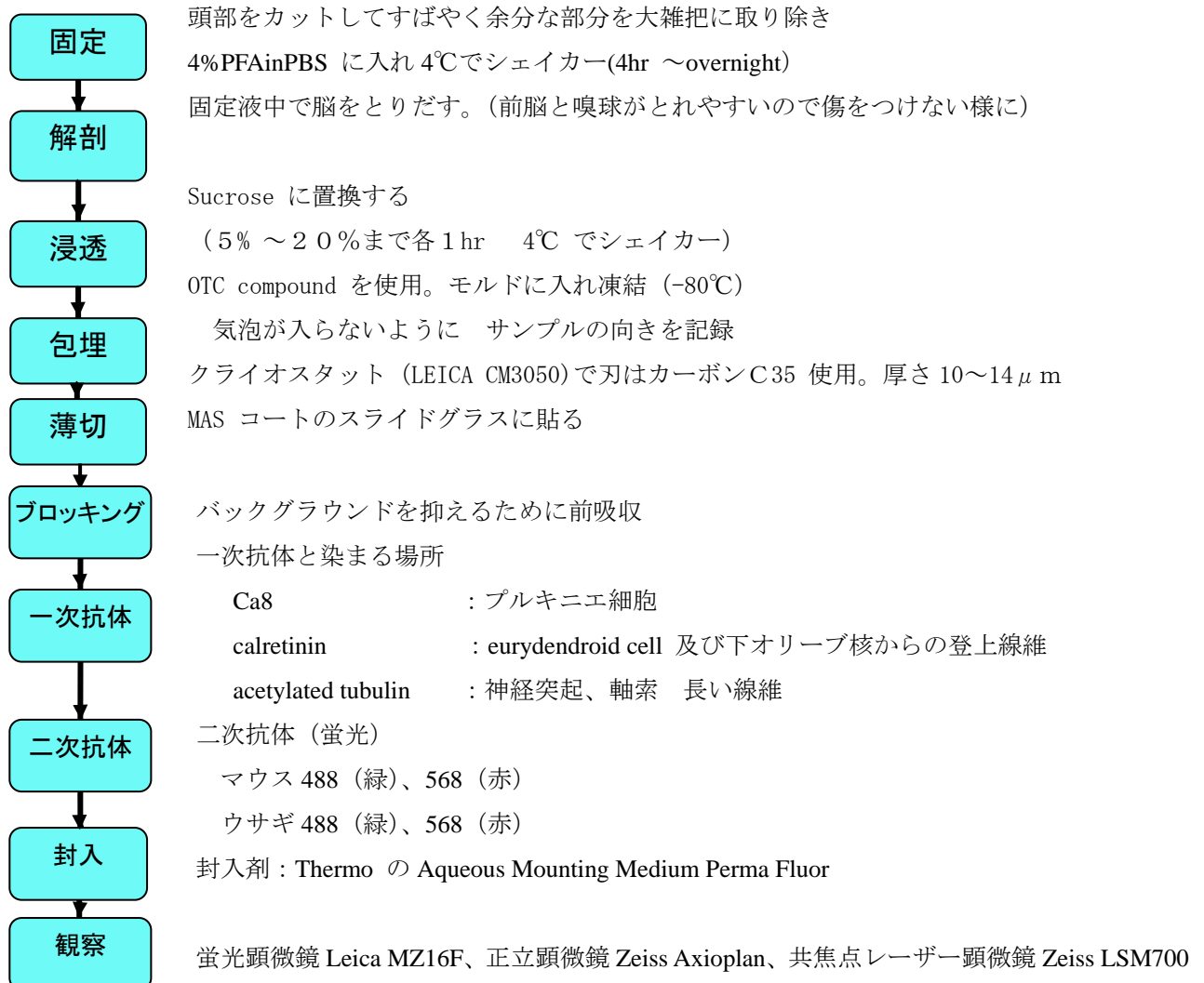


図5 メダカ脳パラフィン切片と小脳構造

2.2 メダカ脳凍結切片作製と免疫染色

ro 変異体は行動学習に異常を示すこと、*Contactin1* (*Contactin1* はマウスでは一つ、魚では二つの遺伝子 *contactin1a*, *1b* からなる) のノックアウトマウスは小脳に異常を示すことから、小脳神経回路に異常を示す可能性が考えられたので、*ro* と野生型の脳の組織切片を作製し免疫染色を行った。

組織切片作成と免疫染色手順

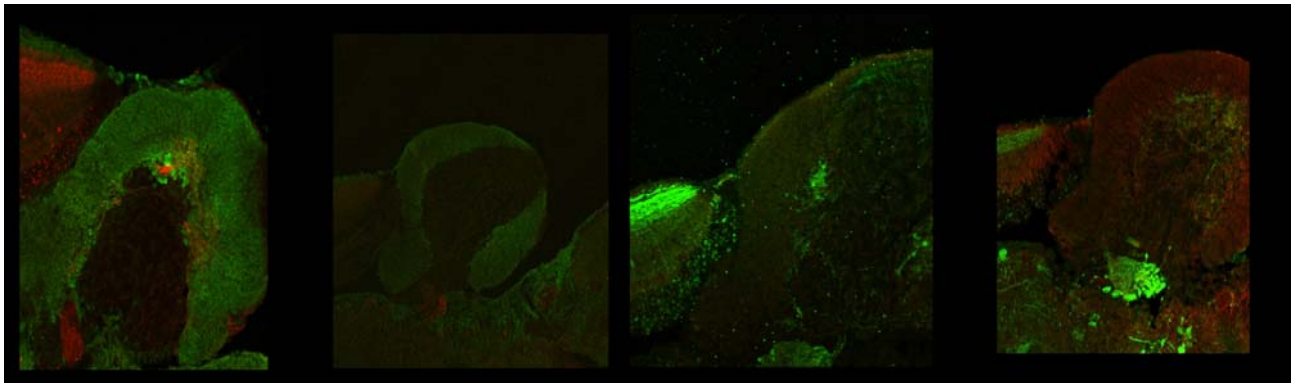


野生型

ro

野生型

ro



Ca8(緑)-calretinin(赤)

acetylated tubulin(赤)-calretinin(緑)

図6 共焦点レーザー顕微鏡画像

小脳のニューロンや組織構築・神経回路の大きな異常が認められなかった。しかし、ro 変異体は運動学習異常など小脳神経回路異常が認められることから、小脳神経回路内のシナプス等の微視的構造に異常があるのではないかと推察された。

3 トランスジェニックフィッシュの開発

メダカにおいて神経回路形成・機能解析を行うための解析ツールが欠けていた。近年ゼブラフィッシュにおいて、ジーン・エンハサートラップと、蛍光タンパク質や光遺伝学手法を組み合わせた解析手法が開発されている。私は、名古屋大学で単離された Tol1・Tol2 トランスポゾンを用いて、メダカの脳の色々なニューロンに転写活性化因子 Gal4FF, LHV2 (Gal4, LexA と転写活性化因子 VP16 の融合タンパク質) を発現するジーン・エンハサートラップ法の開発を行った。

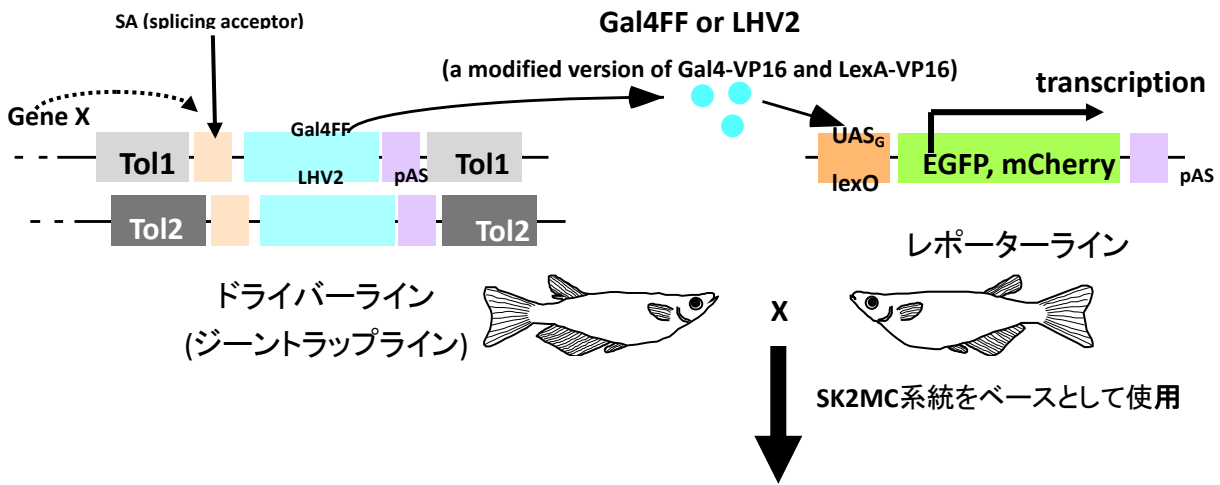
3.1 Transposable element of *Oryzias latipes*, number 1, number 2

Tol2 因子は全長約 4.7kb のトランスポゾンである。トランスポゾンは細胞内においてゲノム上の位置を転移 (transposition) することのできる塩基配列である。動く遺伝子、転移因子 (Transposable element) とも呼ばれる。Tol2 は内部に活性がある転移酵素をコードしている。転移酵素は Tol2 がもつ塩基配列を認識して転移反応を触媒する。Tol2 が転移するために必要なシス塩基配列は、左端から 200bp、右端から 150bp という非常に短いものである。これらの配列間に目的とする DNA を組み込んだプラスミドを構築する。一方、転移酵素遺伝子の cDNA を鋳型として、*in vitro* で mRNA を合成する。Tol2 プラスミドと転移酵素 mRNA をともに受精卵へマイクロインジェクションすると細胞質で転移酵素が合成される。転移酵素は核に移行する。Tol2 プラスミドはおそらく拡散して核内へ移動する。核内では、転移酵素が Tol2 プラスミドから Tol2 部分を切り出す。切り出された Tol2 は転移反応によりゲノム DNA 上に組み込まれる。ゲノムに Tol2 を組み込んだ細胞が、将来、生殖細胞へと分化し、次世代でトランスジェニックが得られる。

3.2 Gal4-UAS, LexA-lexO システム

酵母転写遺伝子 Gal4 は、特異的な DNA 配列 (UAS) に結合して転写を活性化する。Tol1, Tol2 内部に Gal4 を組み込んだ遺伝子コンストラクトを構築した。これらコンストラクトを転移酵素 mRNA とともに受精卵にマイクロインジェクションすると、Gal4 を発現するトランスジェニックフィッシュが作製される。Gal4 の発現を視覚化するために、GFP あるいは mCherry 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

現トランスジェニックフィッシュと交配する。期待通りであればGal4発現に依存してGFPあるいはmCherryが発現する。この方法を用いると様々な細胞・組織でGal4を発現するトランスジェニックフィッシュを作製することができる。Gal4-UASに加えて、大腸菌のDNA結合タンパク質LexAとその結合配列lexOを用いた遺伝子発現システムも作製し、To12プラスミドに組込んだ。

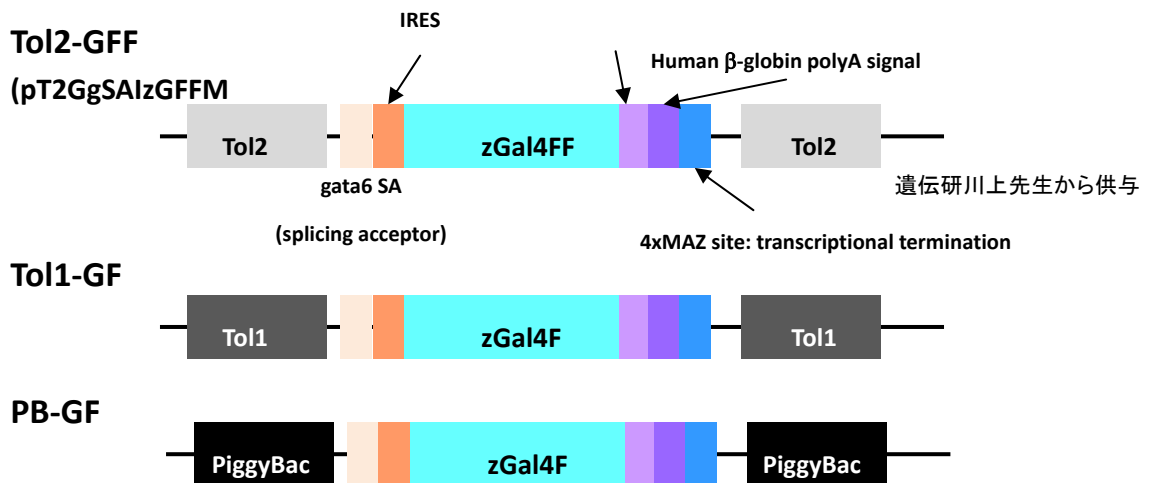


いろんな組織や細胞(特にニューロン)で、任意の遺伝子を発現することができるメダカ系統の開発

図7 メダカを用いたジーントラップ法

ドライバープラスミド

遺伝子導入にはtransposase mRNAとcoinjection



レポータープラスミド、レポーター系統

UAS_G:EGF

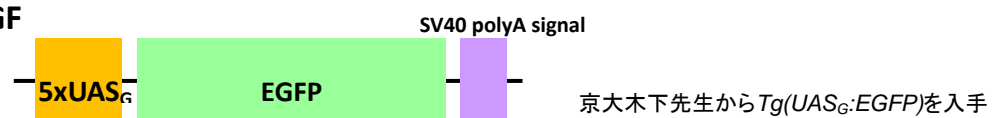
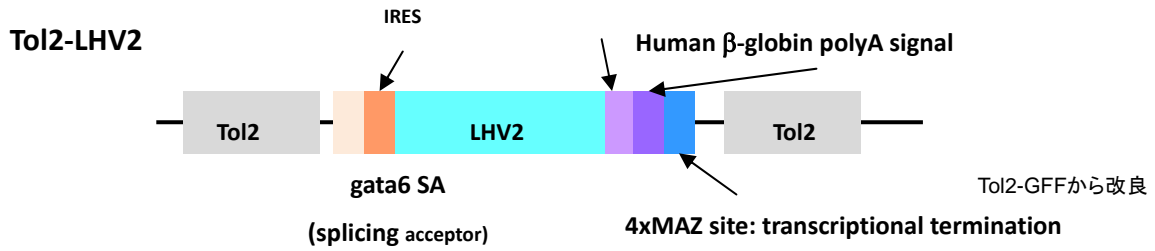


図8 Gal4FF システム

ドライバープラスミド

遺伝子導入にはtrasposase mRNAとcoinjection



レポータープラスミド

遺伝子導入にはIsce-I mRNAとcoinjection

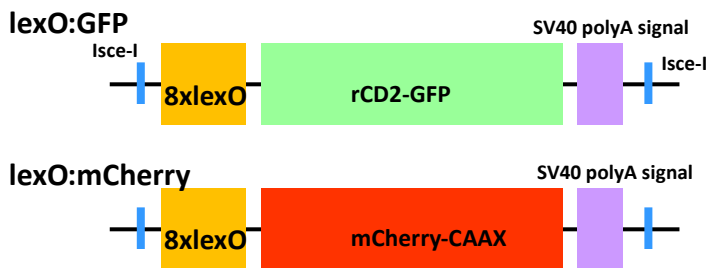


図9 LexA(LHV2)システム

3.3 インジェクション

細胞に薬液等を注入するための技術で中空のガラス等からなるキャピラリー針の先端を細胞に突き刺し、キャピラリー針に充填させた薬剤等を抽出する。

細胞質に注入した外来遺伝子がより多くの細胞に組み込まれることを期待して、多くの場合、1細胞期に注入が行われる。DNA量を増やすと卵の生存率が低くなる。

外来遺伝子のゲノムDNAへの組み込みは、ある確率で起こるためインジェクション個体は遺伝子の組み込まれた細胞と組み込まれていない細胞のモザイクになる。全ての細胞に目的の遺伝子をもつトランスジェニック個体を得るにはこれらモザイクの個体から生殖細胞系に外来遺伝子の組み込まれた個体を選択する必要がある。

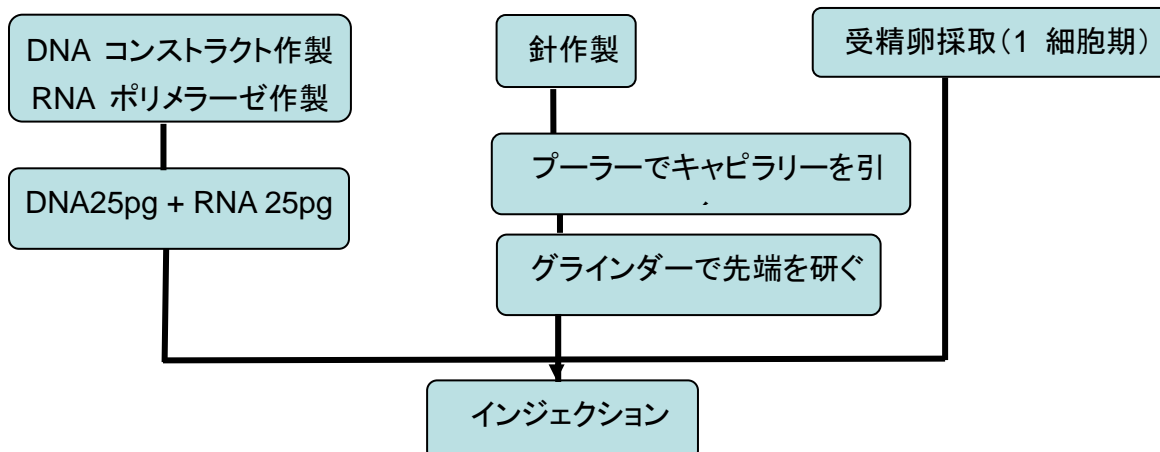


表2 インジェクション結果

	LexA-mCherry (レポーター プラスミド)	Tol2GFF(ドライバープラスミド)		
		5:50	5:25	2.5:25
プラスミド:RNA (ng/μl)		5:50	5:25	2.5:25
インジェクション数		327	855	287
正常ふ化(%)	92	12(3.7)	40(4.7)	38(13.2)
生残成魚	約50			
Genotyping(+)	2/31			

遺伝子導入 (DNA/RNA インジェクション) による胚・稚魚の生存性は向上しており系統の確立を期待している。ドライバーラインとレポーターラインを交配することで、種々のニューロンと神経回路を可視化することができるラインが作製されることが期待される。

謝辞

組織切片については分析機器部門講習会（免疫染色と in situ ハイブリダイゼーションの原理から試料調製など）に参加した後、講習会担当技術職員より業務を担当している技術職員のご紹介いただき、個人的に実習指導して頂く機会を得た。ご協力いただきました分析機器部門講習会関係の各位の皆様にご心より感謝いたします。また懇切丁寧な指導、ご支援を賜りました医学部腫瘍病理教室関係の皆様にご厚く御礼申し上げます。また本研修にあたりご理解とご協力を頂いております生物機能開発利用研究センター動物器官機能日比正彦教授に感謝いたします。