

## ゼブラフィッシュ突然変異体スクリーニングによる 脊椎動物の頭尾軸形成の分子メカニズムの解析

プロジェクト代表者：川村哲規（理工学研究科・助教）

### 1. 研究目的

脊椎動物のからだには、肋骨や四肢などに代表されるように前後軸に沿った特徴的な形態がみられる。このような前後軸の位置による形態の違いは、発生過程において確立される特異性によってもたらされ、ショウジョウバエの遺伝学的解析を端尾とした研究から、この過程において *Hox* 遺伝子群が中心的な役割を果たすことが知られている。ショウジョウバエおよび脊椎動物における *Hox* 遺伝子群がこのようなパターンを形成し前後軸に沿ったアイデンティティを決めていることはこれまでの多くの研究結果から支持されているが、脊椎動物の胚発生において、この秩序だった発現パターンがどのようにして形成されるのかに関しては殆ど分かっていない。本研究では、*Hox* 遺伝子の発現パターンを可視化した組換えゼブラフィッシュを用いて、突然変異体スクリーニングにより、*Hox* 遺伝子の発現異常を示す変異体を単離することを第一の目標としている。

### 2. 結果

#### (1) *Hox* 遺伝子の発現パターンを可視化した組換えゼブラフィッシュの作製

*hoxc8a*, *hoxc10a* の2つの *Hox* 遺伝子に着目し、それぞれの発現パターンを異なる蛍光タンパク質で可視化することとした(図1)。まず、ゼブラフィッシュの *hoxc8a*, *hoxc10a* 遺伝子座を含む BAC を購入し、*hoxc8a* 遺伝子及び *hoxc10a* 遺伝子の発現制御下に蛍光タンパク質をコードする2種類の遺伝子(EGFP 緑色蛍光, tdTomato 赤色蛍光)を、大腸菌 SW102 を用いた相同組み換え法<sup>1</sup>によりそれぞれ導入することに成功した。改変された BAC をゼブラフィッシュ胚に注入して発生を進めた結果、神経管や体節など、*hoxc8a* 遺伝子及び *hoxc10a* 遺伝子の発現する領域において、蛍光がみられることを確認した。現在、改変した BAC をゼブラフィッシュ胚に導入し、ゲノムに組込まれた魚をスクリーニングし、*Hox* 遺伝子の発現を可視化した組換え魚の樹立を目指している。

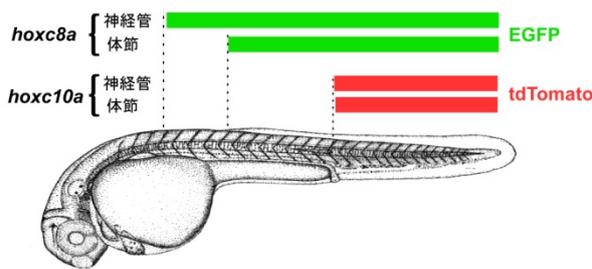


図1. *Hox*遺伝子の発現を可視化したゼブラフィッシュ

#### (2) ゼブラフィッシュを用いた突然変異体スクリーニング

3世代交配法により、突然変異体の単離を行っている。遺伝子導入魚を作製する間に、野生型個体および所属する研究室にある脳領域を GFP で可視化された組換え魚(S4.2)<sup>2</sup>の雄を用いて、アルキル化剤であるエチレンニトロソ尿素による変異原処理<sup>3</sup>を行った。処理した雄を野生型の雌と交配し F1 を作製し、さらに F1 同士を交配させ、F2 ファミリ

一を作製した。現在までに、5つのF2ファミリーを用いてスクリーニングを行い、6つ異なる突然変異体を単離している。例えば、*sud304* 突然変異体に関しては、囲心腔の肥大が顕著に見られ、尾が上方へ曲がっていることが野生型と比較して分かる(図2上)。

*sud309*に関しては、本来野生型において体節の形がV字型になるが、この突然変異体ではU字型であった(図2下)。これは遅筋の分化異常が考えられる。

*sud309a* 突然変異体に関しては、形態的には野生型と外見上区別することはできないが、接触刺激に対して殆ど逃避行動をとらない変異体が得られている(data not shown)。

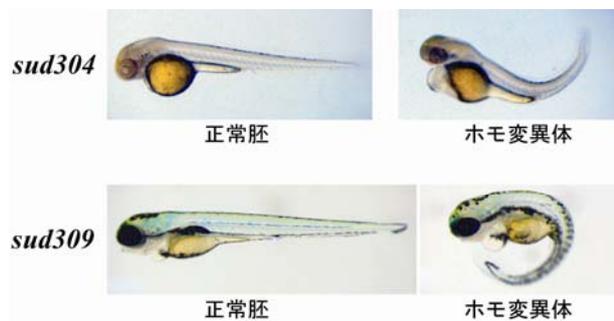


図2. スクリーニングにより単離された突然変異体

### 3. まとめ

これまでの突然変異体スクリーニングの結果から、適切に変異原処理され突然変異体を得られることが分かった。これまで6つのF2ファミリーをスクリーニングし、5つの変異体を単離したが、これはF3スクリーニングを開始した直後であるので、今後、さらにスクリーニングを続け、*Hox* 遺伝子の発現異常を示す変異体を単離し、前後軸形成についてその分子機構を明らかにしていきたいと考えている。また、これまで単離された突然変異体において、Whole-mount *in situ* hybridization 法により頭尾軸の形成における異常の有無を詳細に解析している。

### 4. 参考文献

1. Lee, E. C. et al. A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* **73**, 56-65 (2001).
2. Inoue, F., Parvin, M. S. & Yamasu, K. Transcription of *fgf8* is regulated by activating and repressive cis-elements at the midbrain-hindbrain boundary in zebrafish embryos. *Dev Biol* **316**, 471-86 (2008).
3. Solnica-Krezel, L., Schier, A. F. & Driever, W. Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. *Genetics* **136**, 1401-20 (1994).