

研究課題情報

研究課題名	特定の細胞の標識および操作を可能にするトランスジェニックフィッシュ系統の開発
課題管理番号	20km0210168j0002
統合プロジェクト	ゲノム・データ基盤プロジェクト
9つの連携分野プロジェクト	その他
事業名	ナショナルバイオリソースプロジェクト
タグ (2020)	/研究の性格/その他 /開発フェーズ/基礎的 /対象疾患/該当なく対象とする疾患なし> <input type="button" value="過去のタグ"/>
代表研究機関	大学共同利用機関法人情報・システム研究機構国立遺伝学研究所
研究代表者	(2020) 川上浩一 , 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構国立遺伝学研究所, 国立遺伝学研究所 遺伝形質研究系 発生遺伝学研究室・教授 (2019) 川上浩一 , 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構国立遺伝学研究所, 国立遺伝学研究所 遺伝形質研究系 発生遺伝学研究室・教授
研究期間	2019年度-2020年度

課題への総配分額 15,400

(単位：千円)	2020年度	7,700
	2019年度	7,700

研究概要 (2020)

(1) トランスジェニックゼブラフィッシュ系統の開発。遺伝子トラップ法を用いて、さまざまな細胞・組織・器官特異的にGal4を発現するトランスジェニックフィッシュを新規に250系統樹立する。(2) トランスジェニックゼブラフィッシュ系統のゲノム解析。トランスジェニックフィッシュ系統500系統を対象にして、トランスポゾン挿入部位をサザンプロット法、インバースPCR法等により解析する。(3) ゼブラフィッシュジーントラップ・エンハンサートラップデータベースの整備。トランスジェニックゼブラフィッシュ系統の発現パターン情報、遺伝子情報をデータベースで検索・閲覧可能にする。データベースをアップデートし、作業環境を整備する。(4) トランスジェニックフィッシュ系統の発現パターン、カルシウムイメージングデータの取得。トランスジェニックフィッシュ系統の脳神経回路の二光子励起顕微鏡による解析、および脳神経活動のカルシウムイメージングを行う。(5) 時空間特異的遺伝子ノックアウトするシステムの構築。Gal4-UASシステムとTetON-TREシステムを組み合わせ、時空間特異的に遺伝子をノックアウトするシステムを開発する。

研究成果情報

2020

2019

【成果報告書】

ー 成果の概要

(1) トランスジェニックゼブラフィッシュ系統の開発

当初の計画において、遺伝子トラップ法あるいはエンハンサートラップ法を用いて遺伝学的スクリーンを実施し、さまざまな細胞・組織・器官特異的にGal4を発現するトランスジェニックフィッシュを研究期間内に500系統樹立することを目標にした。令和2年度はパンデミックによる在宅勤務等で研究が十分に実施できない期間もあったが、200系統の同定に成功し、令和元年～令和2年度を通して、計600系統の開発に成功した。

(2) トランスジェニックゼブラフィッシュ系統のゲノム解析

既存のトランスジェニックフィッシュ系統および新規に作製したトランスジェニックフィッシュ系統500系統を対象にして、DNAを抽出しトランスポゾン挿入部位をサザンブロット法により解析した。遺伝子トラップトランスポゾンの単一挿入をもつ系統に関しては、インバースPCR法により挿入部位近傍のゲノム塩基配列を決定した。令和2年度に、250系統の挿入部位近傍の塩基配列決定に成功した。当初の計画において、既存のトランスジェニックフィッシュ系統および新規に作製するトランスジェニックフィッシュ系統1,000系統を対象にしてゲノム解析をおこなうことを計画した。令和2年～令和3年度で、1,000系統についてサザンブロット解析を行い、単一挿入をもつものと複数挿入を持つものに分類した。単一挿入を持つことが判明した450系統について挿入部位近傍のDNA塩基配列決定に成功した。

(3) ゼブラフィッシュジーントラップ・エンハンサートラップデータベースの整備

当初の計画において、トランスジェニックゼブラフィッシュ系統の発現パターン情報、遺伝子情報をデータベースで検索・閲覧可能にすることを目標とした。2020年度は、データベースに随時画像データ、塩基配列データをアップロードし、データベースをアップデートしてきた。データベース構築から10年以上経過していることもあり、プログラムの不具合等から令和3年2月ごろデータの一部が壊れる事故があった。これについては、データを復旧し、その問題を解決し、データベースを整備した。データベースの抜本的な改訂（再構築）については常に念頭においており、特にそのためには経費の獲得が必要であると考えている。

(4) トランスジェニックフィッシュ系統の発現パターン、カルシウムイメージングデータの取得

中枢神経系に発現パターンをもつ約20系統について、二光子励起レーザー顕微鏡により解析し、詳細な発現パターン情報を得た。また受精後5日目の胚を透明化処理し、ライトシート顕微鏡により全身の発現パターン情報を取得することに成功した。これら詳細な発現パターン情報を付与することにより、系統の付加価値が高まる。このような解析を、研究期間終了後も継続して行う。

(5) 時空間特異的に遺伝子発現制御を可能にするシステムの開発

UAS:Cas9トランスジェニックフィッシュを作製し、Gal4発現細胞においてゲノム編集を可能にするシステムを構築した。UAS:TetONトランスジェニックフィッシュを作製し、Gal4発現細胞においてドキシサイクリン依存的に遺伝子発現を可能にするシステムを構築した。

— 学会誌・雑誌等における論文一覧



1.Lee, Y.-H., Kawakami, K., HuangFu, W.-C., Liu, I-H. Chondroitin sulfate proteoglycan 4 regulates zebrafish body axis organization via Wnt/planar cell polarity pathway. PLOS ONE 15, e0230943 (2020).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230943>



2.Kon, T., Omori, Y., Fukuta, K., Wada, H., Watanabe, M., Chen, Z., Iwasaki, M., Mishina, T., Matsuzaki, S-i, Yoshihara, D., Arakawa, J., Kawakami, K., Toyoda, A., Burgess, S.M., Noguchi, H., and Furukawa, T. The genetic basis of morphological diversity in domesticated goldfish. Current Biology 30, 1-15 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.04.034>



3.Kuriki, M., Sato, F., Arai, H.N., Sogabe, M., Kaneko, M., Kiyonari, H., Kawakami, K., Yoshimoto, Y., Shukunami, C., and Sehara-Fujisawa, A. Transient and lineage-restricted requirement of Ebf3 for sternum ossification. Development 147, dev186239 (2020). doi: 10.1242/dev.186239



4.Yoshida, K., Kawakami, K., Abe, G., and Tamura, K. Zebrafish can regenerate endoskeleton in larval pectoralfin but theregenerative ability declines. Developmental Biology 463, 110-123 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.04.010>



5.Iwasaki, M., Yokoi, H., Suzuki, T., Kawakami, K., and Wada, H. Development of the anterior lateral line system through local tissue-tissue interactions in the zebrafish head. Developmental Dynamics 1-15 (2020). DOI: 10.1002/dvdy.225



6.Uemura, Y., Kato, K., Kawakami, K., Kimura, Y., Oda, Y., and Higashijima, S.-i. Neuronal circuits that control rhythmic pectoral fin movements in zebrafish. The Journal of Neuroscience 40(35):6678-6690 (2020).
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1484-20.2020>



7.Itoh, T., Takeuchi, M., Sakagami, M., Asakawa, K., Sumiyama, K., Kawakami, K., Shimizu, T., and Hibi, M. Gsx2 is required for specification of neurons in the inferior olivary nuclei from Ptf1a-expressing neural progenitors in zebrafish. *Development* 147, dev190603 (2020). doi:10.1242/dev.190603



8.Lleras-Forero, L., Newham, E., Teufel, S., Kawakami, K., Hartmann, C., Hammond, C.L., Knight, R.D., and Schulte-Merker, S. Muscle defects due to perturbed somite segmentation contribute to late adult scoliosis *Aging* 12(18):18603-18621 (2020).

9.Solal Bloch, Hanako Hagio, Manon Thomas, Aure´ lie Heuze´ , Jean-Michel Hermel, Elodie Lasserre, Ingrid Colin, Kimiko Saka, Pierre Affaticati, Arnim Jenett, Koichi Kawakami, Naoyuki Yamamoto, Kei Yamamoto. Non-thalamic origin of zebrafish sensory nuclei implies convergent evolution of visual pathways in amniotes and teleosts. *eLife* 2020;9:e54945 (2020). DOI: 10.7554/eLife.54945



10.Asakawa, K., Handa, H., and Kawakami, K. Do not curse the darkness of the spinal cord, light TDP-43. *Neural Regeneration Research* 16 (5), 986-987 (2021). DOI: 10.4103/1673-5374.297073



11.Fernandes, A.M., Mearns, D.S., Donovan, J.C., Larsch, J., Helmbrecht, T.O., Kolsch, Y., Laurell, E., Kawakami, K., Maschio, M.D., and Baier, H. Neural circuitry for stimulus selection in the zebrafish visual system. *Neuron* 109, 1-18 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.12.002>



12.DeMarco, E., Tesmer, A.L., Hech, B., Kawakami, K., and Robles, E. Pyramidal neurons of the zebrafish tectum receive highly convergent input from Torus Longitudinalis. *Frontiers in Neuroanatomy* 15 (2021).



13.Ohno, M., Nikaido, M., Horiuchi, N., Kawakami, K., and Hatta, K. The enteric nervous system in zebrafish larvae can regenerate via migration into the ablated area and proliferation of neural crest-derived cells. *Development* 148, dev195339. (2021).

14.Asakawa, K., Handa, H., and Kawakami, K. Multi-phaseted problems of TDP-43 in selective neuronal vulnerability in ALS. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2021). <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03792-z>



15.Asakawa, K., Handa, H., and Kawakami, K. Illuminating ALS Motor Neurons With Optogenetics in Zebrafish. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9, 640414 (2021). doi: 10.3389/fcell.2021.640414

