

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域「生物の発生・分化・再生」

研究課題「Genetic dissection による神経回路網形成
機構の解析」

研究終了報告書

研究期間 平成 12 年 11 月～平成 17 年 10 月

研究代表者：岡本 仁

(独立行政法人理化学研究所 脳科学総合
研究センター，グループディレクター)

1 研究実施の概要

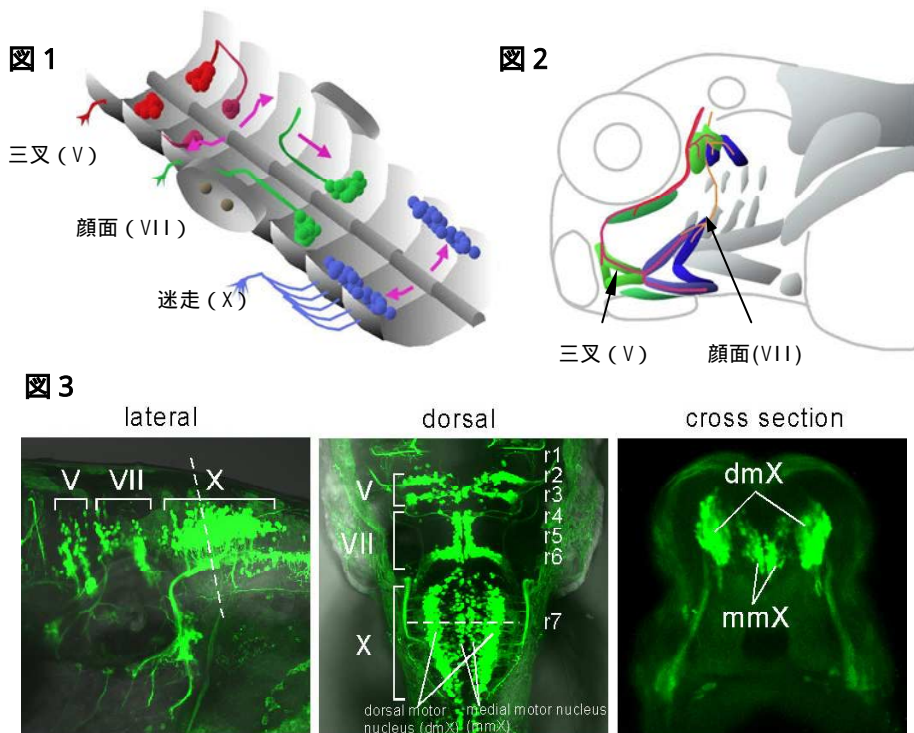
I: 神経系突然変異系統の大規模スクリーニング

後脳では、それぞれの運動神経細胞が誕生した後、それぞれの運動神経細胞ごとに特有な移動と軸索伸展様式を示す。顔面運動神経細胞は、第4菱脳節で誕生し、第6菱脳節間で後方移動する。迷走運動神経細胞は、第7-9菱脳節の腹側正中付近で誕生するが、背外側に移動し、運動神経核を形成する。後核の三叉運動神経細胞は、正中付近で誕生した後、側方に移動し、最終的には、腹外側の白質層内に移動する。これらの運動神経細胞の軸索は、後脳の外で、それぞれに特有な経路に沿って伸展し、分岐する(図1、2)。

このような振る舞いが比較的単純なことから、後脳運動神経細胞は、神経細胞の分化、移動、標的認識の機構を調べる上で、最も単純なモデルシステムとなる。

後脳の構造は脊椎動物の進化を通じて高度に保存されている。我々は、このことを利用し、脊椎動物の中でも最も単純な神経系を持ち、胚が透明で、胚操作や遺伝学的解析を容易に行えるゼブラフィッシュを用いて、それぞれの後脳運動神経細胞が、分化し移動し軸索伸展する過程の各ステップごとに特異的に影響を及ぼす突然変異系統を単離した。さらに、それらの原因遺伝子を究明することによって、神経細胞誕生から機能を開始するまでの過程に重要な役割を果たす遺伝子を、発生段階の順に系統的かつ網羅的に同定することを目指した。

そのために、我々は運動神経細胞特異的に GFP 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し(図3)、これに突然変異を誘発し、生きた胚を観察することによって、突然変異を同定するという、世界で最初のスクリーニング法を採用した。また、複数の研究グループと共同することによって、他の神経分化の局面にも着目し、突然変異系統を単離した。



合計で 1572F2 ファミリー、1817 ゲノムをスクリーニングし、

[1]後脳運動神経細胞の分化

(誕生、細胞移動、軸索伸展)

[2]網膜の層形成

[3]側線神経の伸展

[4]耳胞と三半規管の分化

の過程に異常を示す突然変異を合計 109 系統確立することに成功した。これらのうちのポジショナルクローニングを進めた結果、現在までに以下のことが明らかになってきた。

運動神経細胞の移動の突然変異の解析から、

顔面運動神経細胞の移動異常の突然変異群は、細胞平面極性と上皮極性に関わる遺伝子群に欠損を持っていた。モザイク解析の結果、これらの遺伝子群は、神経上皮細胞で働き、移動中の顔面運動神経細胞が、基底膜側から逸脱するのを防いでいることが明らかになった。同じような分子メカニズムは、哺乳類の後脳で働いているだけでなく、大脳皮質の形成においても、神経前駆細胞の脳室帯から軟膜側への移動などにおいても共通して働いていることが期待され、細胞平面極性遺伝子群の新たな機能として注目される。

迷走運動神経細胞の背外側への移動では、誕生から目的地に達するまでの全ての段階に特異的に影響を及ぼす突然変異系統を単離することに成功した。さらに、ポジショナルクロニングの結果、正しい目的地を通り過ぎて、背側まで運動神経細胞が移動してしまう突然変異では、タンパク質の糖鎖付加過程の異常が疑われ、細胞移動の停止において糖鎖の果たす役割の重要性が示唆された。

三叉運動神経細胞の腹外側への移動に異常を示す突然変異の解析から、細胞移動制御蛋白の遺伝子のエピジェネティックな修飾の重要性が示唆された。

運動神経細胞の軸索伸展の突然変異の解析から、

既知の軸索伸展制御因子が、経時的に正しい組合せで発現することの重要性が示唆された。

運動神経細胞とは関係が知られていなかった転写因子が、成長因子の受容体発現を介して、軸索伸展を制御している可能性が示唆された。

新規の因子が、軸索伸展に特異的に関わることが明らかになった。

網膜の層形成の突然変異の解析から、

神経幹細胞の分裂と分化のスイッチングに関わる遺伝子を同定した。

細胞極性と、細胞接着と、細胞増殖の関係を明らかにした。

側線神経の伸展異常の突然変異系統群の中から、

神経系腹側正中構造の分化異常の突然変異(you)を同定し、ポジショナルクロニングの結果、背中側正中に発現するのに、腹側正中で発現するソニック・ヘッジホグの機能を阻害する細胞外マトリックスタンパクを同定することに成功した。

II: ケージド mRNA による時空間特異的遺伝子発現制御技術の開発

ゼブラフィッシュで単離された遺伝子の機能を詳細に解析するために、UCSD の Roger Tsien 教授の研究室で新規のケージド化合物 6-bromo-4-diazomethyl-7-hydroxycoumarin (Bhc-diazo)の合成に成功した古田寿昭博士(東邦大)と共同研究を行い、試験管内で合成した mRNA のリン酸基に、新規に合成された光感受性ケージング用試剤 6-bromo-4-diazomethyl-7-hydroxycoumarin (Bhc-diazo)をエステル結合し、mRNA の翻訳活性を可逆的に不活化し、長波長の紫外線照射によって Bhc を再解離させ、再び mRNA の活性を回復することができる技術を開発した(mRNA ケージン

グ法)。

さらに、mRNA ケージング法による異所的遺伝子発現誘導と標的遺伝子発現阻害法の併用による形質救済効果を指標とした遺伝子機能間のエピスタシス解析により脊椎動物前脳発達の制御に関わる Six3 と Lhx2 の支配関係を明らかにした。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

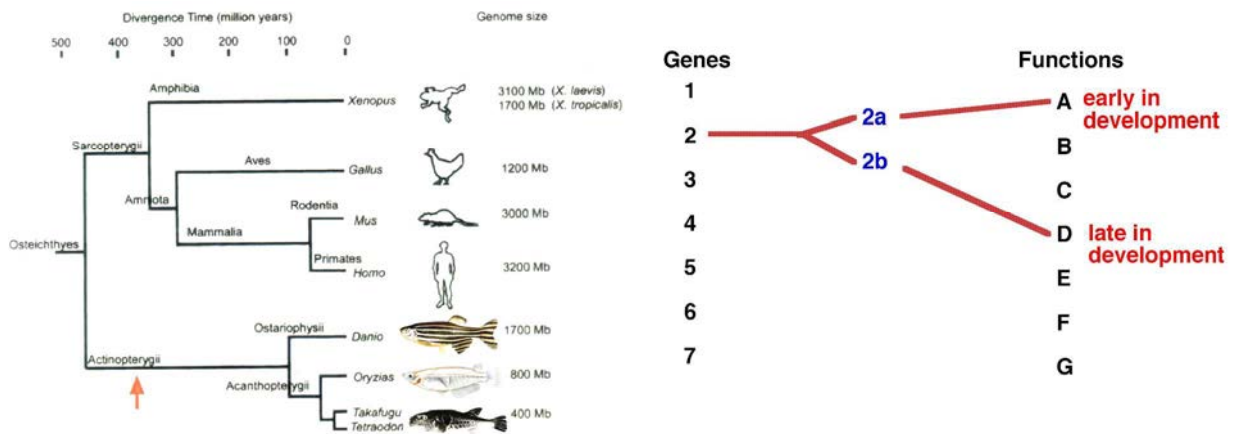
人を含めた多くの動物で全ゲノムの配列が明らかになりつつあり、遺伝子の転写部位に関してはおよそ予測がつく時代を迎えつつある。しかしながら、個々の遺伝子産物が複雑な生命現象の中でどのような機能を担うのかという問題を解明するためには、生命現象との対応を調べる必要があり、ゲノム配列から予測される遺伝子とその機能を迅速に対応づけるシステムを確立することが急務となっている。脊椎動物の全遺伝子のうち大多数が脳で発現しているといわれるが、これまでに機能がわかっているものはむしろわずかにすぎない。

本研究では、脳を構成する神経細胞が分化し神経回路を形成する過程に関与する遺伝子を系統的に同定するために、ゼブラフィッシュを用いて神経回路網(特に運動神経)の形成に異常を持つ突然変異体の大規模スクリーニングを行い、そのスクリーニングの結果得られた突然変異の原因遺伝子をクローニングすることを第一の目的とした。

更にゼブラフィッシュ胚において、任意の遺伝子を任意の時期と組織で発現誘導できるケージド mRNA 法を用い、遺伝子の異所性発現を行うことによって、脳の形成に関わる遺伝子の機能解析を行うことを第二の目的とした。

背景1

進化過程で、硬骨魚類への系譜は、ヒトへの系譜から約4億5千年前に分離した後、全ゲノムレベルでの重複を一度行い、その後、重複された遺伝子同士で、与えられた生育環境に最も適合するように各遺伝子に変異を蓄積しながら、発現パターン等の重複をなくすことによって、役割分担を行ってきた。その結果、哺乳類など他の脊椎動物では一つの遺伝子が担っていた、発生段階の初期と後期の2種類の役割りが、多くの場合で、重複した2つの遺伝子によって役割り分担されたため、発生の後期に働く方の遺伝子の方だけに突然変異が起きても、体の外見や脳の神経回路の微妙な変化として形質があらわれるだけで、致死にならないことが多くなった。このことが、脊椎動物の中でも硬骨魚類が、もっとも大きな種の多様性を持つにいたった原因の一つであると考えられている。また、突然変異スクリーニングの観点からみると、硬骨魚類を実験材料とすることによって、ランダムな突然変異の誘発によって、脳の発生など発生過程の後期に異常を示す突然変異を単離できる可能性がますます期待できる。



我々は、このような硬骨魚類の特性を活かすために、ゼブラフィッシュを実験材料として、全遺伝子を少なくとも一度破壊する飽和的突然変異によって、神経系突然変異を大規模かつ系統的に単離することを旨とした。

突然変異系統のスクリーニングの概要

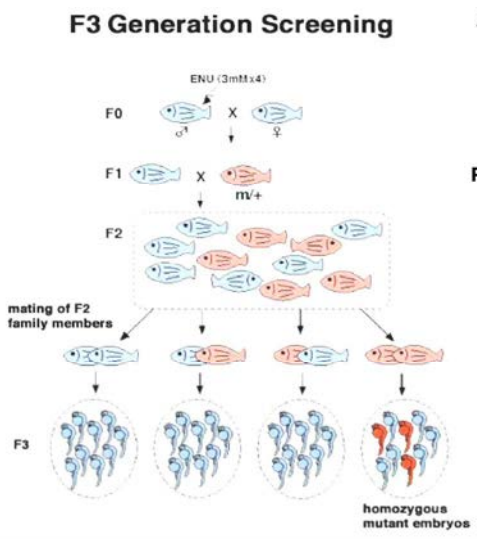
突然変異の誘発は、オスの成魚を、2.5~3mM の ENU(ethylNitrosourea)を含む常温の飼育水にXX 時間放置することを、1 日1回、一週間お行きに4回行い、4週間目以降に未処理のメスの成魚と交配することによって、F1 世代を得た。無作為に選んだ F1 世代のオスとメスを交配して F2 ファミリーを作製した。同一の F2 ファミリーの中からは、無作為にオスとメスを選び、原則 8 ペアアの交配が成功するまで、交配をくり返した。

下左図に示すように、8 ペアアの交配によって、一つの F2 ファミリーに所属する魚が持つ突然変異の内の 90% について、ホモ接合体での形質を観察することができると期待できる。即ち、親である F1 のオスとメスの 2 組のゲノムに入った突然変異のうち 90% を検知できる。これを、 $2(\text{ゲノム}) \times 0.9 = 1.8$ ゲノム分調べることができると表現する。

これまでの経験から、ENU 処理によって、殆どの遺伝子の突然変異は、1000F2 ファミリーのうちで 2~3 ファミリーで検出される。従って、全遺伝子を破壊することを旨とする場合、最低 500F2 ファミリー、標準で 1000~1500F2 ファミリーをスクリーニングすることが望まれる。この場合、スクリーニングされる全ゲノム数は以下の式によって計算される(下右図)。

スクリーニング
される全ゲノム数

$$= \sum_{N_i=1}^{\text{全 F2 ファミリー数}} [1 - (3/4)^{N_i}]$$



A frequency of getting a mutation in specific gene by ENU treatment
0.2 ~ 0.3 %

So, at least 500, or ideally **1000 F2 families** should be examined.

Probability of succeeding in identifying a mutant after crossing n pairs
p=1-(3/4)ⁿ When n=8, p=0.9

For successful 8 crosses, **12 pairs** should be mated.

Total number of crosses **12 x 1000=12000**

The number of embryos to be observed **8x1000 x 50 = 400,000**

突然変異スクリーニングの方針

Islet-1 は、運動神経細胞特異的に発現する LIM ホメオドメイン型転写因子で、脊椎動物の進化の過程で構造的に最も保存されている転写因子の一つである。我々は、Islet-1 遺伝子は、タンパクをコードする領域のみならず、転写制御領域も、高度に保存されていることを発見した。更に、ゼブラフィッシュ・ゲノムの Islet-1 遺伝子の下流 15kb と 35kb 下流に見い出されるエンハンサー配列と類似する配列を、ヒトやマウスのゲノムの Islet-1 遺伝子の約 150kb と 350kb 下流の領域で同定し、それぞれの配列が、ゼブラフィッシュでもマウスでも、同じ種類の筋肉を支配する運動神経細胞のサブタイプでの特異的発現を制御していることを、トランスジェニック・ゼブラフィッシュ胚とトランスジェニック・マウス胚でのエンハンサー活性の比較によって明らかにした(図 1)。

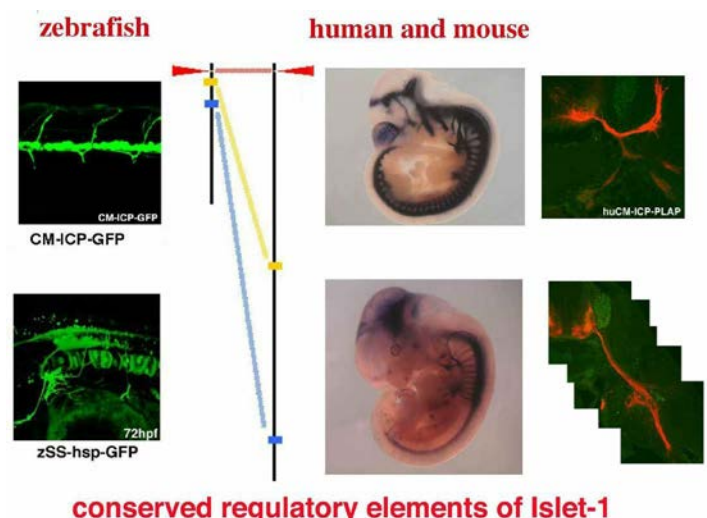


図 1

このように、運動神経細胞の分化の過程での重要な制御機構に関しては、硬骨魚類と哺乳動物との間でも、保存されていることが期待される。我々は、このような期待のもとに、Islet-1 遺伝子のエンハンサーの制御下で、後脳の運動神経細胞と感覚神経節細胞とで GFP を特異的に発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュ胚を材料として、主に後脳運動神経細胞の分化や軸索伸展に異常を示す突然変異のスクリーニングを行うこととした。

更に、蛍光顕微鏡による観察は、胚発生の特定の時期に集中して行わなければならない、スクリーニングに従事するメンバーの心理的負担がかなり大きいことや、運動神経以外の神経軸索の観察等も行えないなどの理由から、抗アセチル化 チューブリン抗体を用いて、神経軸索を DAB 発色によって染色した永久標本も作製し、観察を行った。

ゼブラフィッシュを用いた飽和的突然変異スクリーニングを行える機会は、日本国内では多くは臨めないという事情を考慮し、網膜、側線神経、耳胞・三半規管の分化異常もスクリーニングし、共同研究所によって解析できる体制を作った。

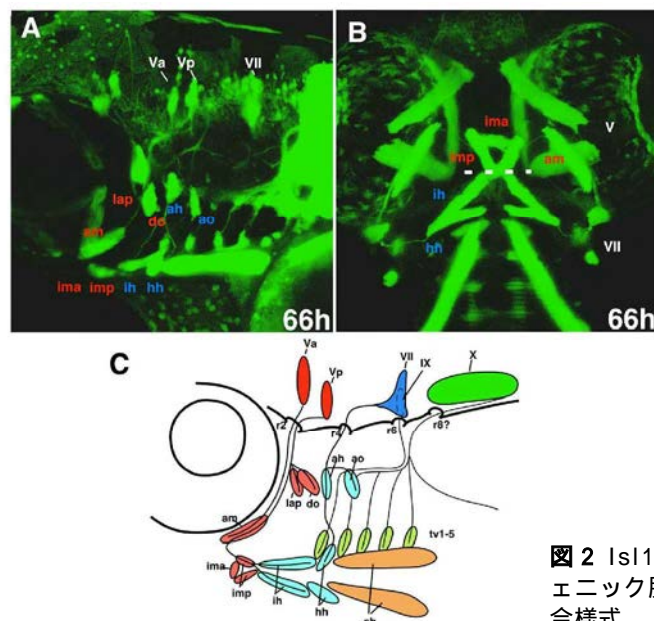
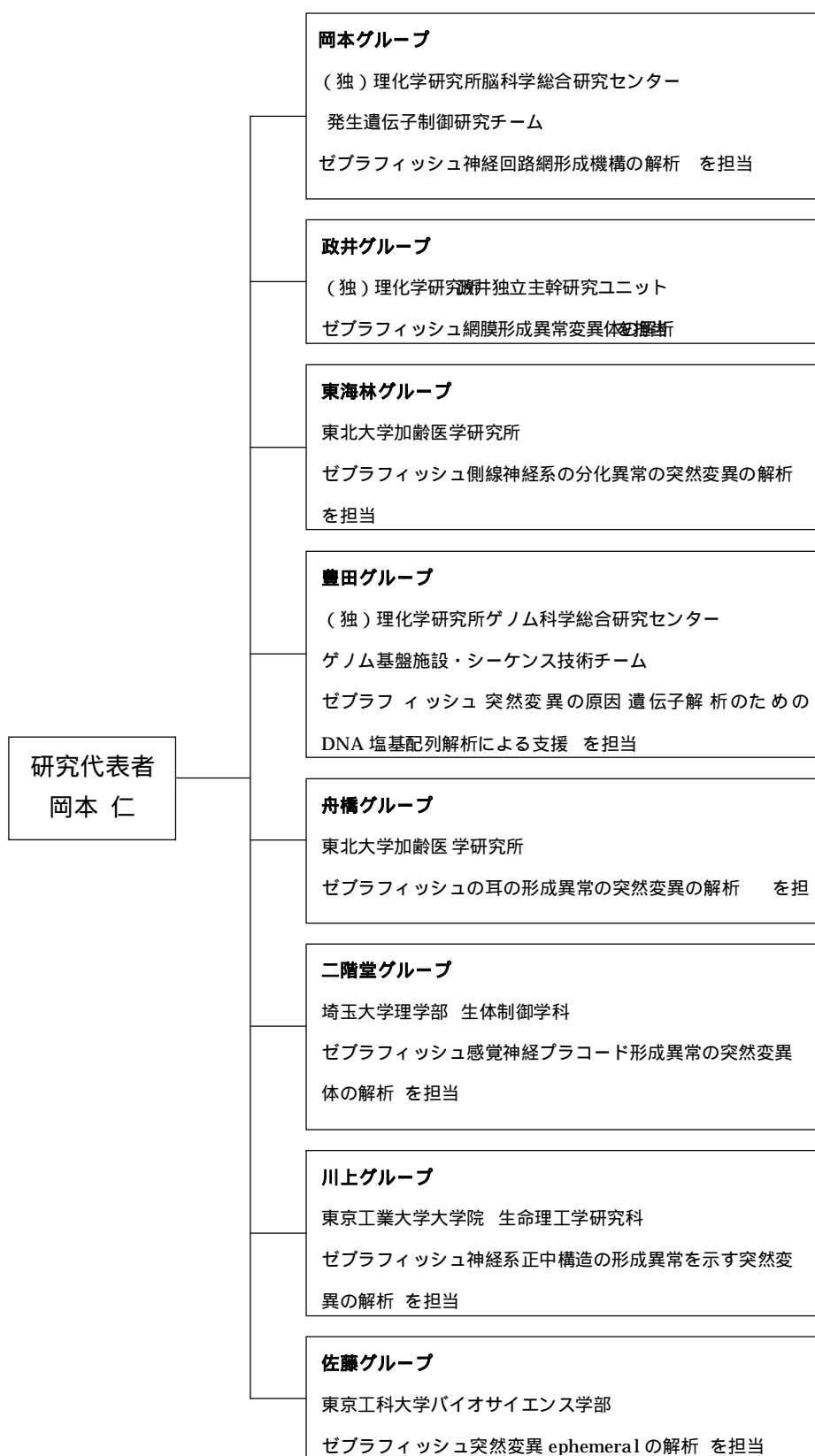


図2 Islet-1-GFP と actin-GFP の2重トランスジェニック胚での、後脳運動神経と顎筋群との結合様式

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3-1

サブテーマ名

神経系突然変異系統の大規模スクリーニング

特に、後脳運動神経細胞分化に異常を示す突然変異系統の単離と解析

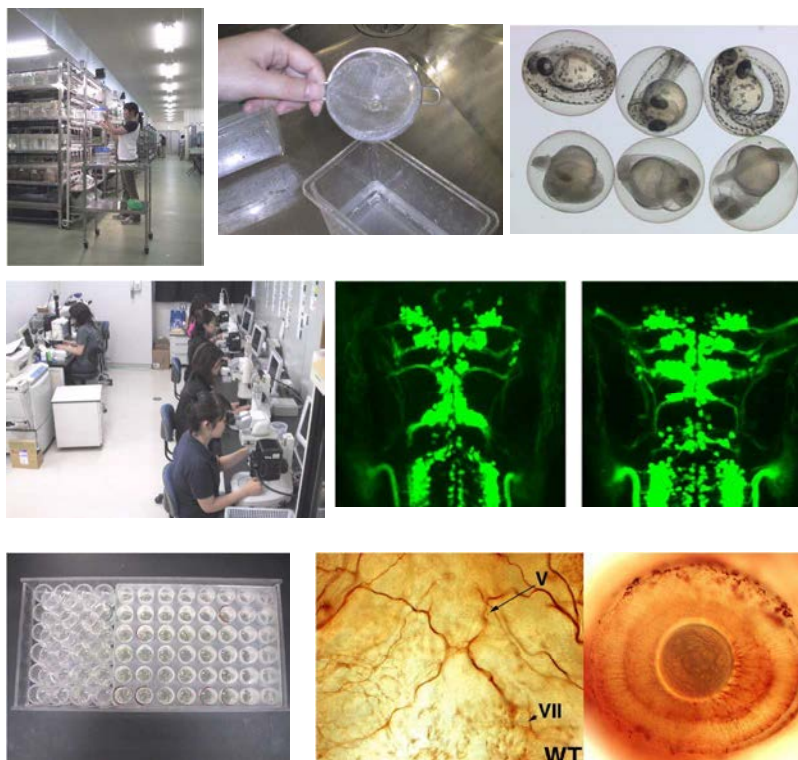
担当

岡本グループ(理化学研究所、脳科学総合研究センター)

3-1-1:突然変異系統のスクリーニングの実際

スクリーニングは、以下の表に示すように、全行程2週間のスケジュールで、1週間ごとにずらしながら行った。

	Mon	Tue	Wed	Thr	Fri	Sat
第1週	全体ミーティング 掛け合わせ	採卵/ソーティング	1d形態観察	2d形態観察 GFP観察 (神経核形態観察)	3d tubulin染色用 サンプル固定 ->1次抗体反応	耳蝸形態観察
第2週	3d tubulin染色 ->2次抗体反応	3d tubulin染色 ->発色反応	3d tubulin染色 ->軸索走行/神経核形態観察		観察データの整理 データベースへの 入力	



図に示すごとく、合計で 1572F2 ファミリー、1817 ゲノムをスクリーニングし、

[1]後脳運動神経細胞の分化

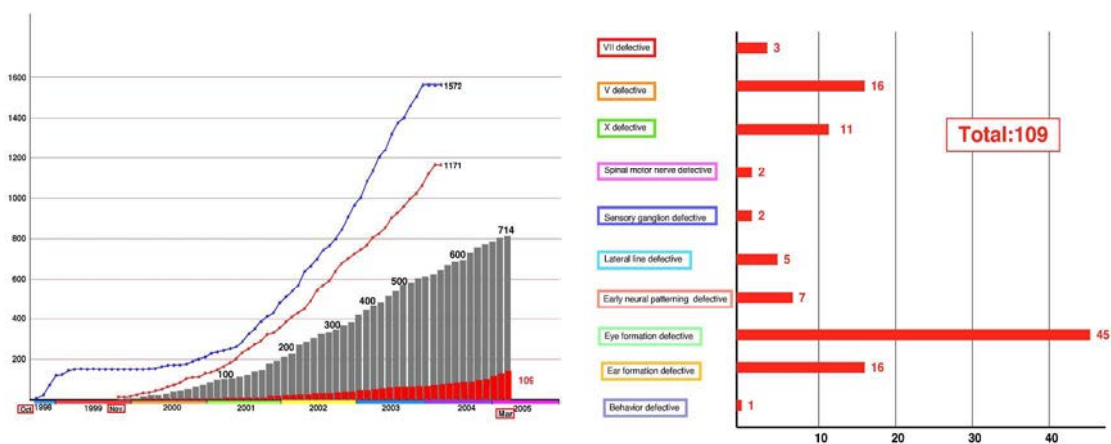
(誕生、細胞移動、軸索伸展)

[2]網膜の層形成

[3]側線神経の伸展

[4]耳胞と三半規管の分化

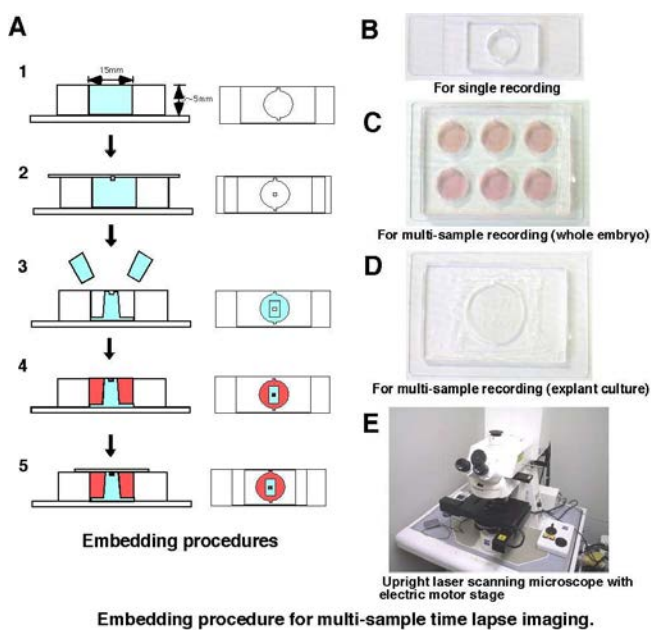
の過程に異常を示す突然変異を合計 109 系統確立することに成功した。



3-1-2: multi-sample time lapse imaging system の構築

(田中英臣)

本研究において単離された突然変異体は全て劣性変異体であるため、表現型の出現頻度は25%である。このため、表現型の詳細な解析のために live-imaging を行う場合、複数の個体について同時に画像を取得し、得られたデータ群から突然変異体の表現型について解析することが必要になる。この問題を克服するため、multi-sample time lapse imaging system の構築を試みた。我々は複数個体を独立した状態で包埋出来るチャンバーを独自に開発した。このチ



チャンバー内に包埋されたサンプルは、密閉状態で12時間から24時間正常に発生することが可能である。また、培養液を変えることによって、explant cultureにも対応出来る。このチャンバーを電動ステージ(MCU28, Carl Zeiss社)を搭載した共焦点レーザー顕微鏡(LSM510, Carl Zeiss社)に装着し、付属のソフトウェア(Multi time series Rev.3.2P, Carl Zeiss社)で駆動することにより、複数個体から自動的に連続してtime-lapse imagingすることが可能になった。本研究におけるtime-lapse imagingによる解析は、全てこのシステムを用いて行われている。

3-1-3: 後脳運動神経細胞分化突然変異系統の単離と解析の成果

[I] 顔面運動神経細胞(第7脳神経)の後方移動の突然変異群の解析

(和田浩則、岩崎美樹)

本研究において、我々は、神経細胞に必要な未知の分子を系統的に調べるために、ゼブラフィッシュを用いた突然変異体の大規模スクリーニングを行った。顔面神経細胞の移動に異常を示す新規突然変異体を3系統単離し、ポジショナルクローニングによって、それらの原因遺伝子を同定した。

その結果、平面極性と上皮極性に関わるタンパク群が相互作用し、神経上皮細胞が、移動中の顔面運動神経細胞を基底膜側に排除するという、新しい現象が明らかになってきた。

ここで発見されたのと同じ制御機構は、哺乳類を含むほかの脊椎動物の後脳でも、顔面運動神経細胞の移動において使われているだけではなく、大脳皮質の発生過程で、神経前駆細胞の脳室帯から軟膜への放射状移動などにおいても利用されている可能性がある。

1-1: 顔面神経細胞の位置に異常を示す新規突然変異体の解析

我々は、得られた多くの変異体の中から、顔面神経細胞の移動に異常を示すものに注目した。脊椎動物の後脳において、顔面神経の運動神経細胞は、菱脳節4番(r4)に生まれ、後方へ移動し、菱脳節6番(r6)で神経核を形成する(図1)。このような特徴的な顔面神経細胞の移動メカニズムはまったくわかっていない。顔面神経は、中枢における細胞移動とガイド機構、神経回路形成機構の解明に有効なモデルであると考えた。

我々は、顔面神経核の形成位置に異常を示

Migration of the facial (nVII) motor neurons in mice and zebrafish

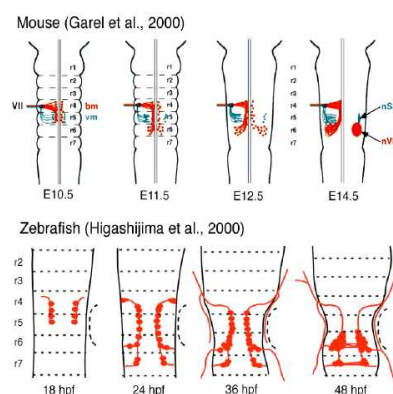


図1 マウスとゼブラフィッシュの顔面神経細胞の移動様式

す3つの新規突然変異体, *landlocked (llk)*, *off-road (ord)* および *off-limit (olt)*を解析した。*llk* 胚、*olt*胚では r4 に, *ord*胚では r4-5 に異所的に顔面神経核を形成した(図2)。

菱脳節特異的な *hoxb1a*, *krox20*, *mafB* の発現パターンは正常であることから, これらの突然変異体の後脳のパターンングは正常であると考えられた。*llk* 胚と *olt* 胚では, r4 に生まれたすべての顔面神経細胞は, 移動しなかった。一方, *ord* 胚では, 一部の神経細胞が r5 に移動したが, 後脳腹側部の正常の移動ルートから外れていた。

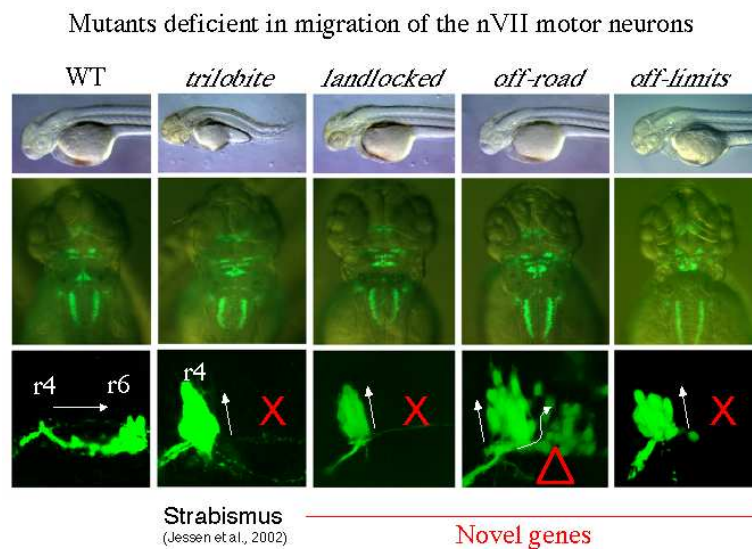


図2 新規突然変異体 *llk*, *ord* および *olt* における顔面神経細胞移動の異常

また, 細胞移植実験から *llk* 遺伝子は細胞非自律的に働く分子であることを示した(図3) (Wada et al., 2005)。また, *ord* 遺伝子 *olt* 遺伝子についても同様であった(投稿準備中)。

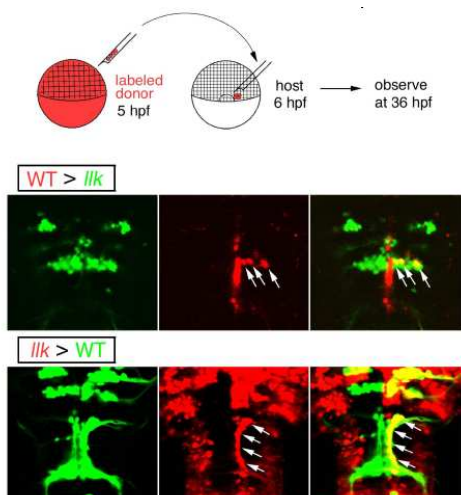


図3 *llk* 遺伝子は細胞非自律的に働くことを示す移植実験

I-2: 新規突然変異体 *landlocked* 原因遺伝子の単離と機能解析

我々は、ポジショナル・クローニング法によって、*llk* 変異体の原因遺伝子を同定した。変異遺伝子座マッピングの結果、*llk* 遺伝子座は連鎖群7番に位置した。

Representational Difference Analyses 法(RDA)によって、近傍の DNA 断片を単離し、その配列をもとに PAC ライブラリー・スクリーニングとゲノム・データベースから、*llk* 遺伝子座を含む~500kb のシーケンス情報を得た。このゲノム領域に存在する新規遺伝子 *scribble1* に、点突然変異を見いだした(図4)(Wada et al., 2005)

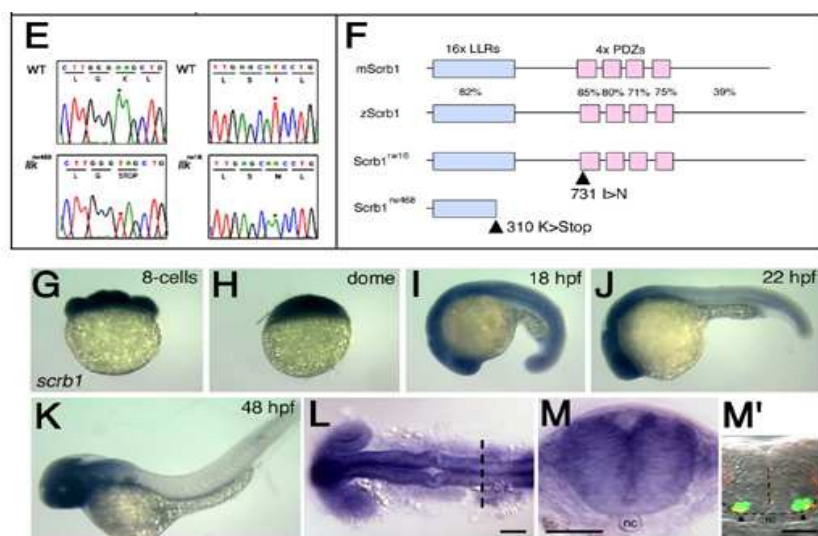


図4 *llk* 遺伝子座は Scribble1 をコードする。

scrbl 遺伝子に対するアンチセンス・モルフォリノオリゴを用い機能阻害実験を行った結果、*llk* 変異体胚と同じ顔面神経細胞の移動の異常が特異的に生じた(図5)。さらにレスキュー実験により、*scrbl* 遺伝子が細胞移動を引き起こす原因遺伝子であることが明らかになった(図5)(Wada et al., 2005)。

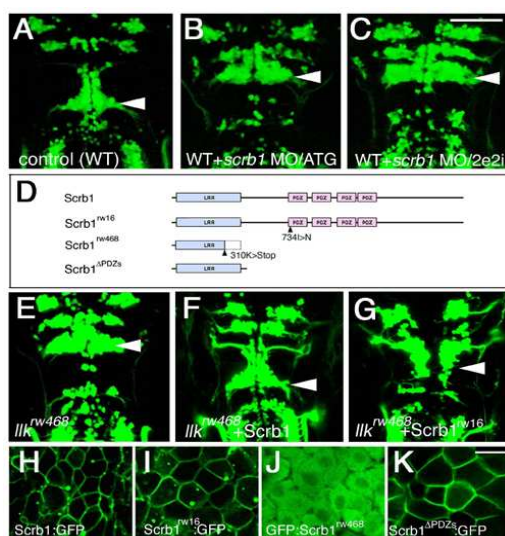


図5 *scrbl* 遺伝子の機能阻害・機能回復実験

さらに、母性由来の *scrb* 遺伝子の役割を調べたところ、gastrulation の際の、コンバージェンス・エクステンション運動に働いていることが明らかになった（図6 , Wada et al., 2005）。また、Scrb 遺伝子は、Stbm と遺伝的に相互作用することがわかった（図6 , Wada et al., 2005）。

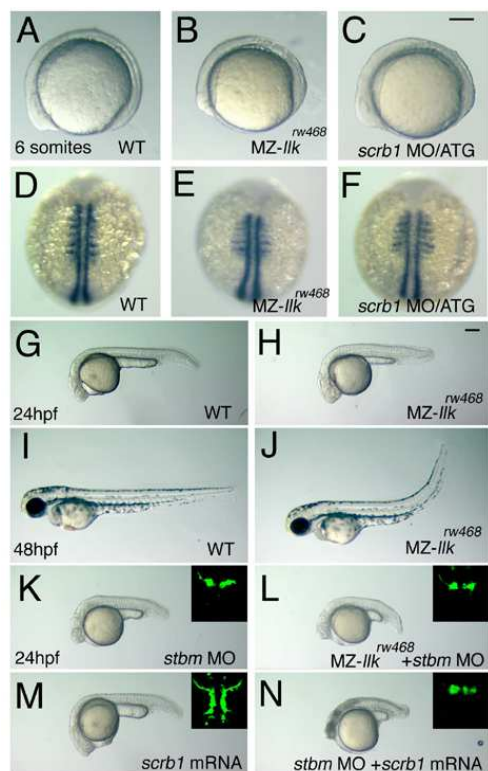


図6 初期胚の形態形成における *scrb* 遺伝子の役割。

I-3: 新規突然変異体 *off-road* 原因遺伝子の単離

補足資料参照（未公開）

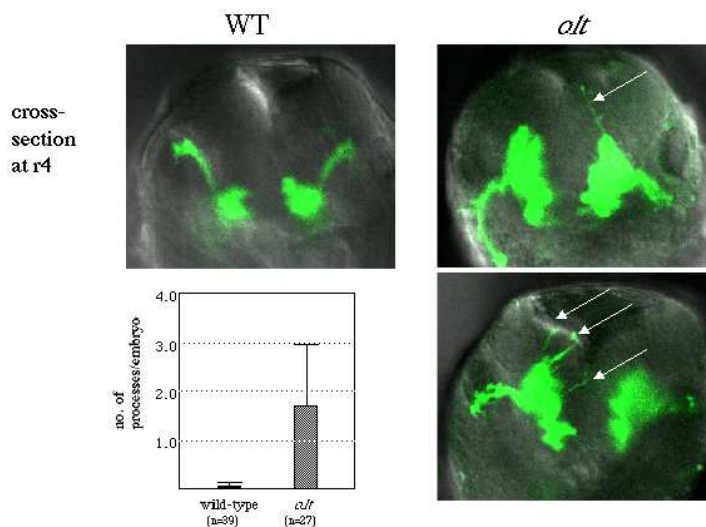
図9 *olt* 胚において運動神経細胞は異常なプロセスを伸ばす。

I-4: 新規突然変異体 *off-limit* 原因遺伝子の単離

補足資料参照（未公開）

I-5: 細胞移動における、*landlocked*, *off-road*, *off-limit* の役割

これらの3つの遺伝子がコードする分子は、ショウジョウバエの平面極性、およ



び、上皮極性の決定に関わる。さらに、すでに述べた通り、モザイク解析の結果から、いずれも神経上皮で働いていることが予想された。

移動中の運動神経細胞を生体内で観察すると、変異体では、異常なプロセスを神経上皮内の脳室方向に伸ばしていることがわかった(図9、投稿準備中)。

つぎに、細胞移植実験により、神経上皮のモザイク胚を作成した。

変異体由来の細胞が野生型胚の神経上皮に取り込まれると、その細胞塊の中に、運動神経細胞は侵入した。

逆に、野生型由来細胞が、変異体胚の神経上皮に取り込まれると、運動神経細胞は、野生型由来細胞の細胞塊の中には侵入しなかった(図10、投稿準備中)。

以上の結果から、野生型の神経上皮には、移動中の顔面運動神経細胞を排除し、これらの細胞が後脳のもっとも基底膜側をどうする様に保つ働きがあることがわかった。

1-6: まとめ

我々は、本研究によって、顔面神経細胞の移動に必要な3つの遺伝子を同定した。

これらの遺伝子はいずれも、細胞の極性の決定に関わる分子であった(補足資料参照、未公開)。

これらの分子は神経上皮細胞を制御し、そこを通過する顔面運動神経細胞が神経上皮細胞層に侵入するのを妨げるという形で、顔面運動神経細胞の移動方向を決定していた(図11)。

本研究によって、我々は、細胞極性決定シグナルの新しい役割を発見した。これは、今まで知られていなかった新規の細胞移動のメカニズムであり、神経発生機構にあらたな視野をもたらすものである。

III] 迷走運動神経細胞(第10脳神経)の移動の突然変異系統の単離と解析

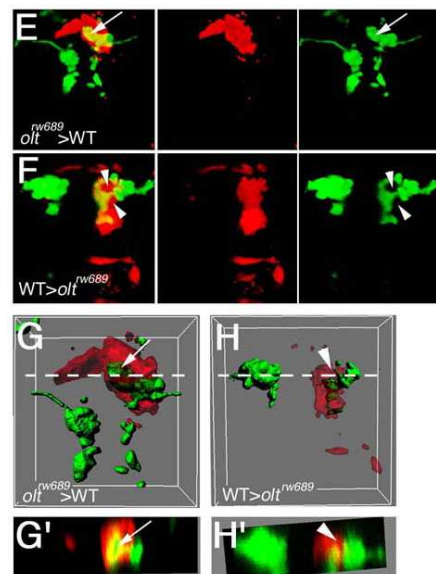


図10 モザイク胚における、運動神経細胞移動の解析

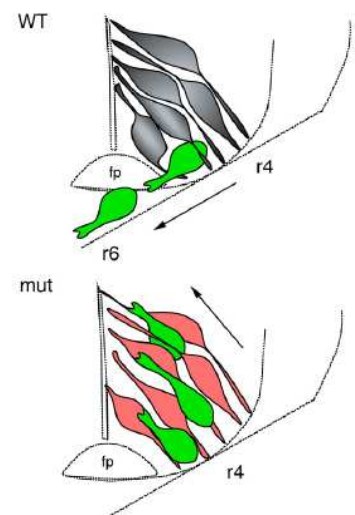


図11 運動神経細胞移動における神経上皮細胞の役割を示す模式図

(木下滋晴、鶴岡佐知子)

II-1: はじめに

迷走神経は、鰓弓由来の横紋筋の運動支配と心臓を含む胸・腹部臓器の副交感性支配を行う混合性神経で、個体の恒常性維持に密接に関与する重要な脳神経である(図1)。

そのため、その発生異常は重篤な障害を引き起こすと考えられ、例えば、乳幼児突然死症候群の患者で迷走神経核の形成不全が報告されている(Macchi et al., 2002)。

しかしながら現在、迷走神経の発生機構の詳細は明らかでない。そこで我々は *islet1-GFP* トランスジェニック系統のゼブラフィッシュを用いた飽和突然変異体スクリーニングにより、迷走神経の発生に異常を示す変異体を探索した。

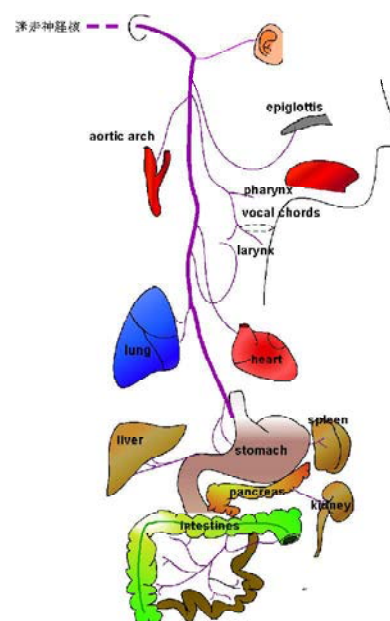


図1. 迷走神経は延髄にその運動核を持ち、咽頭、喉頭の横紋筋の運動支配と心臓を含む体幹部ほぼすべての臓器の副交感性支配を行う。

II-2: 迷走神経核の形成には前駆細胞の移動と集合が重要である

迷走運動神経細胞は支配する組織の異なる複数の核を形成する。

ほ乳類では迷走神経背側運動核と擬核の2核があり、前者が内臓の副交感性支配、後者が心臓の副交感性支配と咽頭および喉頭の横紋筋の運動支配を行う(図2)。

ゼブラフィッシュ胚においても迷走神経核は2つ存在する。

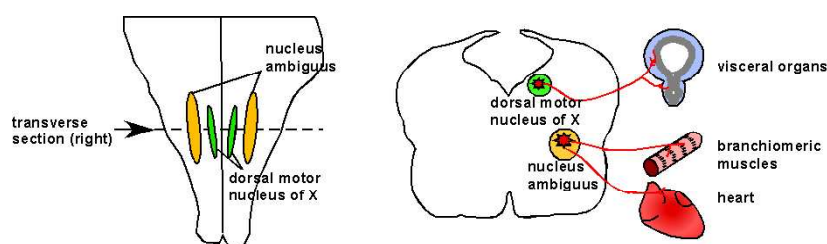


図2. ほ乳類の迷走神経核の分布. 迷走神経背側運動核が内臓の副交感性支配、擬核が心臓の副交感性支配と咽頭および喉頭の横紋筋の運動支配を行う。

islet1-GFP 系統の2日胚のGFP蛍光を観察すると、迷走神経核は菱脳節8番に背外側と腹内側の2つの細胞群として認められる(図3)。

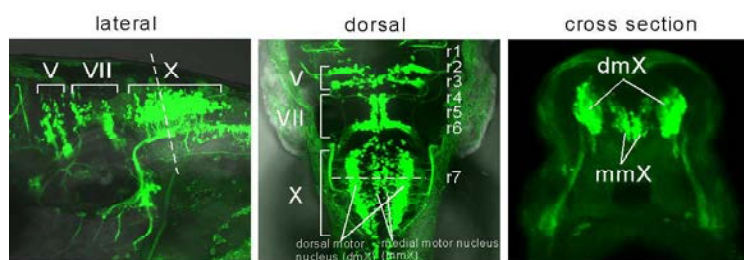


図3 .islet-1-GFP トランスジェニックゼブラフィッシュの2日胚における迷走神経核の分布.迷走神経核(X)は菱脳節8番(r8)に発生し、背外側のdmXと内腹側のmmXを形成する. V, 三叉神経核; VII, 顔面神経核; X, 迷走神経核.

以下、前者を**迷走神経背側核(dmX)**、後者を**迷走神経正中核(mmX)**とする。

dmXを構成する迷走運動神経細胞は支配する組織に応じてさらに複数の亜核に分かれる。

rhodamine-dextranを用いた細胞染色から、dmX吻側前方の迷走運動神経細胞が第4および第5鰓弓枝、吻側後方が第6鰓弓枝、dmX尾側が内蔵枝を伸長することが示された(図4)。

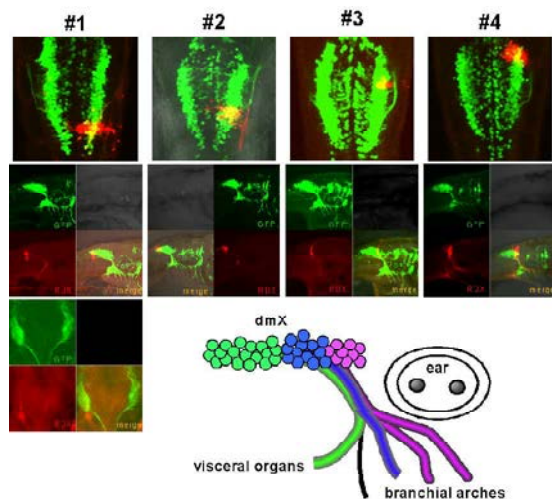


図4 .ローダミンデキストラン染色により明らかになった、dmXのカラム構造と軸索との対応関係. dmX尾側に色素をおいた#1および#2の試料では内臓枝が染色されている. 一方、dmXの吻側後方に色素おいた#3、吻側前方においた#4ではそれぞれ第6鰓弓枝、第4および5鰓弓枝が染色されている.

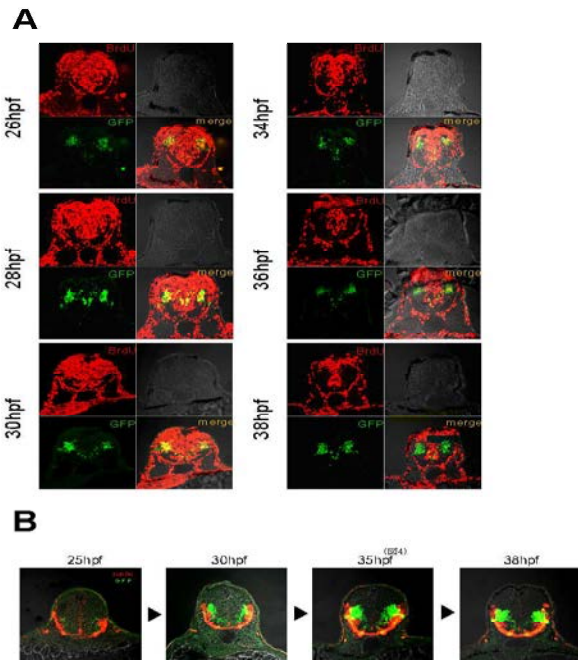


図 5. 迷走神経核の発生 .A, BrdU ラベルによる dmX と mmX のバースデイト解析 .授精後 26 ~ 38 時間の胚を BrdU でラベルし、その後 48 時間まで発生を進行させ抗 BrdU (赤) および GFP (緑) 抗体で免疫染色した .dmX は授精後 26 時間から 38 時間にかけて徐々に BrdU ネガティブになるが、mmX は BrdU ポジティブのままである .B, dmX の形成過程 .授精後 26 ~ 38 時間の胚を、抗 アセチル化 tubulin (赤) および GFP (緑) 抗体で免疫染色した .dmX 前駆細胞は赤く染まる神経軸索の層に沿うように分布し、やがて dmX 予定形成領域に集合する .

BrdU を用い dmX および mmX の分化過程を観察した結果、dmX を構成する神経細胞は授精後 28 ~ 38 時間 (hpf) まで徐々に、mmX はそれ以降に分化することが示された (図 5A)。この時 dmX 前駆細胞は神経管の腹側正中付近で分化し、その後白質層に沿って背外側へ移動し、将来 dmX が形成される領域に集合した (図 5B)。

我々はさらに、L15 培地中で培養したゼブラフィッシュ後脳組織中における神経細胞の挙動を共焦点レーザー顕微鏡で time lapse イメージングする手法を確立した。これにより dmX 前駆細胞の移動と集合の過程、その後発生する mmX の形成の様子を詳細に観察できるようになった。

こうした知見と観察手法を基に、我々は迷走神経核の形成異常を示す突然変異体の飽和的スクリーニングを行い、迷走神経核の形成異常を示す変異体として 1816.5 ゲノムのスクリーニングから 11 系統を単離した (表 1)。

Table 1. Overview of mutants isolated by our genetic screening

Total family	1171
Total genome	1816.5
Isolated mutants	715
Kept mutants	166
trigeminal mutants	14
facial mutants	10
vagus mutants	14

II-3: dmX 前駆細胞が過剰に移動する変異体 *towhead*, *bajada* の単離

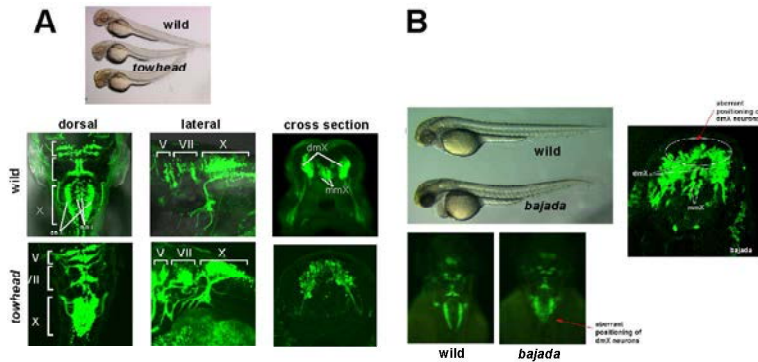


図6 .dmX 前駆細胞が過剰に移動する突然変異体 . A, *towhead* 変異体における迷走神経核の分布 . B, *bajada* 変異体における迷走神経核の分布 . いずれの変異体においても dmX のさらに背側に異所的に神経細胞が分布している .

towhead および *bajada* 変異体では迷走運動神経細胞が神経管背側に異所的に分布する (図6)。これら異所的な細胞は 38 hpf までに分化を終了することから、これらは dmX を構成する神経細胞と同じ発生の系譜のもつと考えられた。

そこで、*towhead* 変異体における dmX 前駆細胞の移動を時間的な連続切片から観察したところ、変異体における同前駆細胞は予定領域で止まらず、さらに背側へ過剰に移動していた (図7)。

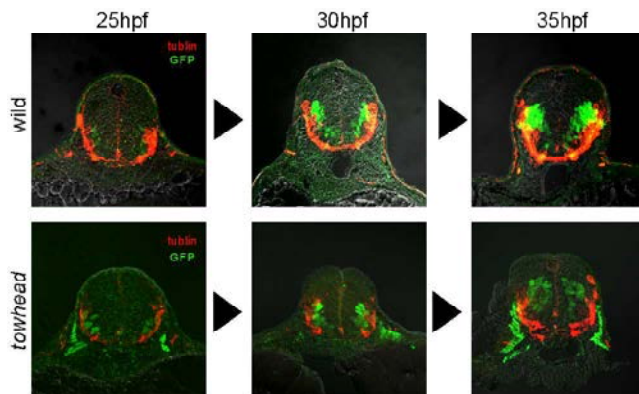


図7 . *towhead* 変異体における dmX 前駆細胞の過剰な移動 . 野生型では dmX 前駆細胞は軸索層 (赤) の背側の端付近で移動を終え集合するが、変異体ではさらに背側へと移動し核を形成しない .

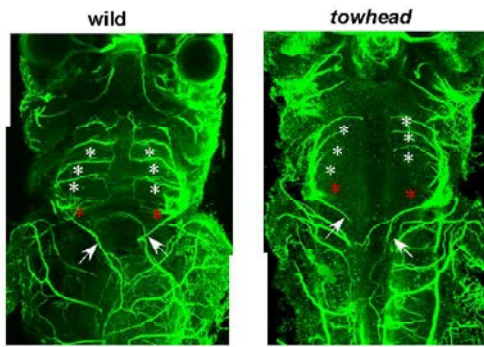


図 8. *towhead* 変異体では迷走神経核から伸びる心臓枝 (赤星印) および内臓枝 (矢印) の伸展が不全である. 白星印, 鰓弓枝

towhead 変異体では *dmX* の形成異常に加えて、心臓枝および内臓枝の顕著な形成不全を示す (図 8)。この時、鰓弓枝は正常なため、当該変異体は迷走神経の臓性支配を行う細胞集団の軸索伸展に特異的に異常を示す可能性があり興味深い。

また、脊髄の運動神経の発生にも異常があり、変異体では上行する軸索を持つ脊髄の運動神経がほとんど観察されない (図 9)。

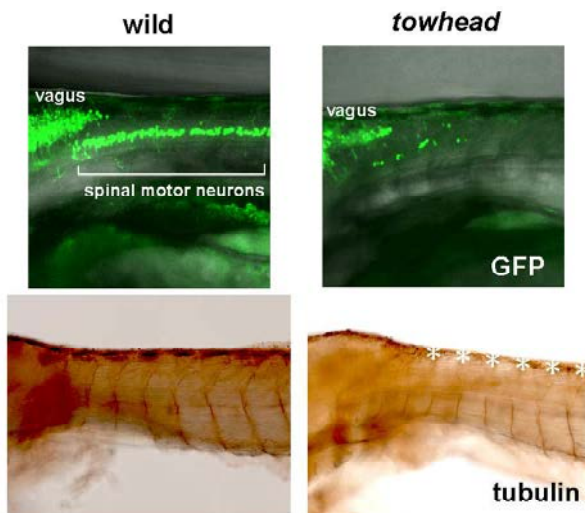


図 9. *towhead* 変異体における脊髄の運動神経の異常. 変異体では *islet1* 陽性の脊髄の運動神経細胞の数が大きく減少している. また、tubulin 染色で軸索を観察すると、変異体では脊髄の運動神経から星印の方に向かって上行する軸索がほとんど観察されない.

II-4: *towhead* 突然変異原因遺伝子のポジショナルクローニング

補足資料参照 (未公開)

II-5: *bajada* 遺伝子のポジショナルクローニング

補足資料参照(未公開)

II-6: dmX 前駆細胞の移動経路と集合に異常を示す変異体 (*alluvion*)

alluvion 変異体では迷走運動神経細胞が一様に分布し、明瞭な核が認められない(図 13A)。

変異体で異所的に分布する細胞は 38 hpf までに分化を終了することから、*alluvion* 変異は dmX の形成異常を示すと考えられた。*alluvion* 変異体での dmX 前駆細胞の移動を time lapse イメージングで観察すると、同前駆細胞は神経管の腹側正中付近から背側へと移動し、予定領域に集合せず、その結果背側正中に異所的に分布した(図 13B および C)。

これは *alluvion* 遺伝子が迷走運動神経細胞の移動および集合過程における細胞間接着に影響していることを示唆する。

alluvion 遺伝子は現在染色体 14 番上にマップされている。

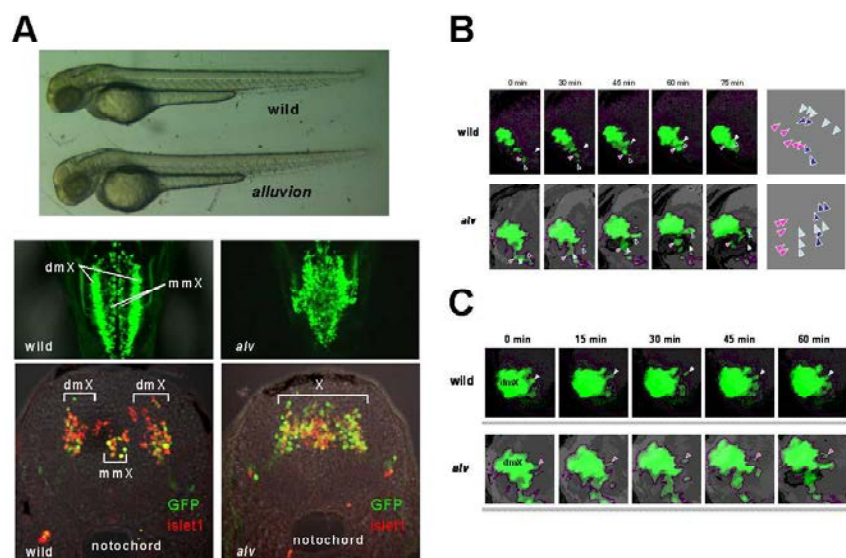


図 13. dmX 前駆細胞の移動の方向と集合に異常を示す突然変異体 . A, *alluvion* 変異体における迷走神経核の分布 . 変異体では左右の dmX および mmX の間に一様に神経細胞が分布し両核を区別できない . B, 野生型では dmX 前駆細胞は背外側へと移動するが、変異体では背側へ移動していた . C, 野生型では核から飛び出した dmX 前駆細胞は再び核へと引き戻されるが、変異体では同様の細胞はそのまま集合外で止まっていた .

II-7: dmX 前駆細胞の移動不全を示す変異体 (*double vagus, croissant, holm*)

double vagus および *croissant* 変異体では正常な dmX に加え、さらにその腹外側に異所的な核が存在する(図 14)。

この異所的な核は dmX とおなじ発生経過を示すことから、移動の途中で止まった dmX 前駆細胞により形成されると考えられた。

double vagus 遺伝子は現在染色体 5 番上にマップされており、組み換え 0 のマーカー (0/98meiosis) を同定している。

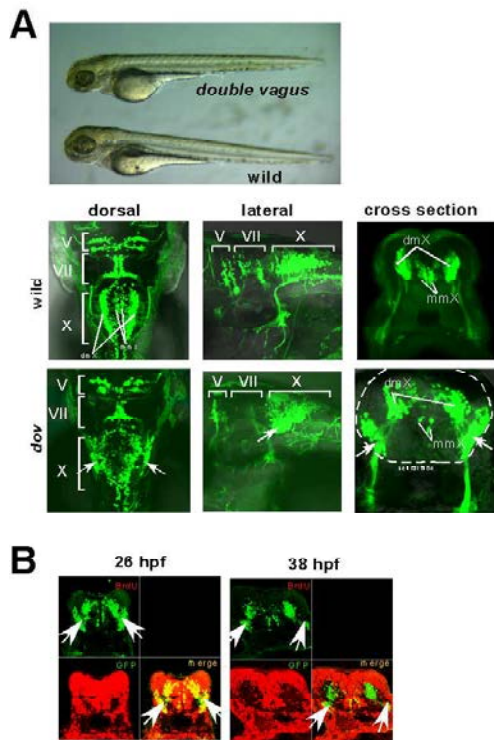


図 14. dmX 前駆細胞の移動が途中で止まる突然変異体 . A, *double vagus* 変異体における迷走神経核の分布 . 変異体では dmX および mmX に加えて、さらに矢印で示された左右一対の核が形成される . B, BrdU ラベルの結果、異所的な核 (矢印) は dmX と同じ発生の系譜をもつことが示された .

また、*holm* 変異体では腹側正中に異所的に GFP 陽性細胞が分布する(図 15)。これらは移動できずに止まっている dmX 前駆細胞なのかもしれない。

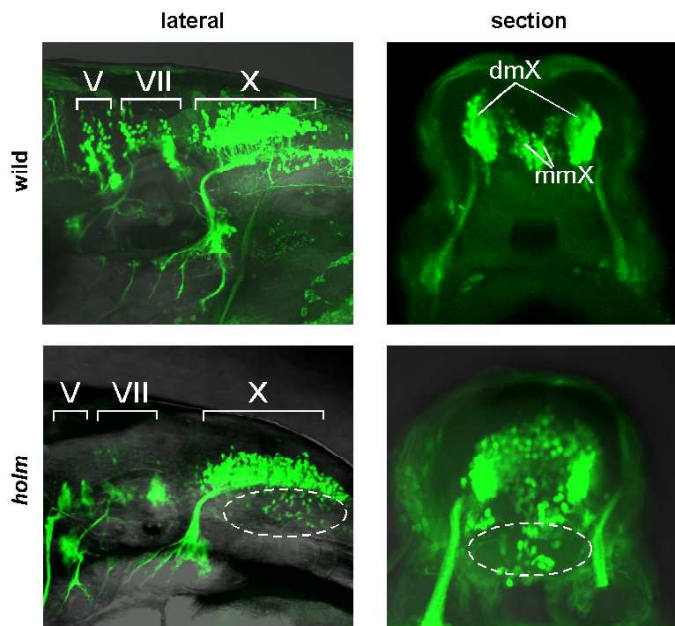


図 15. *holm* 変異体における異所的な迷走運動神経細胞の分布. 変異体では神経管腹側正中付近(白破線枠)に野生型ではみられない異所的な迷走運動神経細胞が分布する.

II-8: dmX の特定の領域の神経細胞

の分布異常 (*crescent*, *sling*)

crescent や *sling* 変異体では dmX の尾側の迷走運動神経細胞の分布に異常を示す(図 16)。一方で dmX の吻側には顕著な異常はみられず、これら変異体では dmX の一部の亜核の形成に異常を示すのかもしれない。

crescent 遺伝子は現在染色体 1 番上にマップされており、近傍のマーカ―として原因遺伝子から 1.5cM のものを同定している。

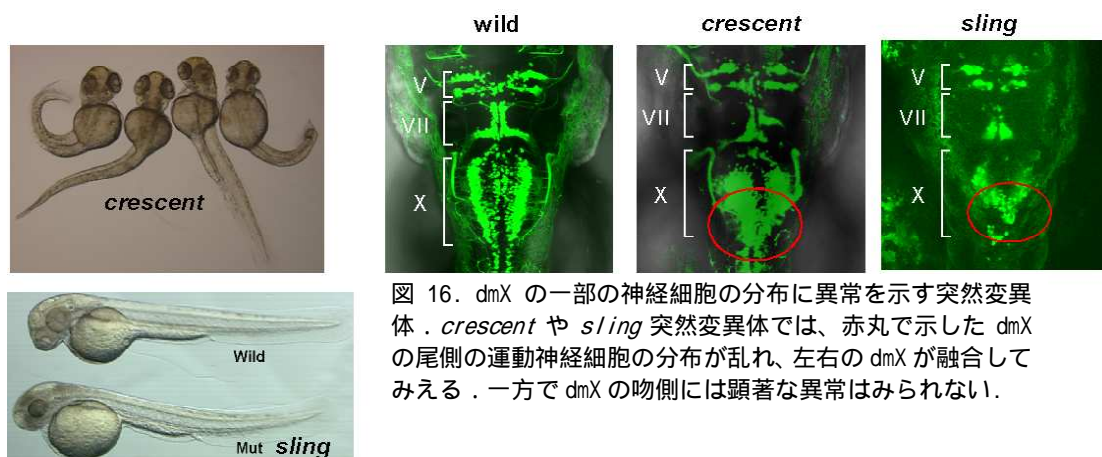


図 16. dmX の一部の神経細胞の分布に異常を示す突然変異体. *crescent* や *sling* 突然変異体では、赤丸で示した dmX の尾側の運動神経細胞の分布が乱れ、左右の dmX が融合して見える. 一方で dmX の吻側には顕著な異常はみられない.

II-9: おわりに

我々が単離した迷走神経核の発生異常を示す 11 系統の変異体は、お互いに相補せず、その表

現形も多様である。これらはそれぞれ異なる遺伝子をコードし、迷走神経核形成の異なる段階で働いているものと考えられる。

そのうち、前駆細胞の過剰な移動を示す突然変異についてはグリコシル化関連遺伝子はその原因遺伝子の候補として挙げられている(補足資料参照)。

これまで迷走神経核の発生と糖鎖との関連は報告がない。

その他の変異体についても現在マッピングを進めているが、このように迷走神経核の形成の変異体を網羅的に解析していくことで、いまだ謎の多い迷走神経核の発生機序の分子レベルでの総合的な理解につながっていくことが期待される。

参考文献

Becker, D., J., and Lowe, J., B. (2003) Fucose: biosynthesis and biological function in mammals.

Glycobiology. 13: 41R-53R.

Haltiwanger, R., S., and Lowe, J., B. (2004) Role of glycosylation in development. Annu Rev Biochem.

73:491-537.

石川裕之, 笹村剛司, 鮎川友紀, 松野健治 (2005) Notch シグナル伝達経路における O-フコシル化の機能. 糖鎖と病気

Ito, Y., Hagihara, S., Matsuo, I., and Totani, K. (2005) Structural approaches to the study of

oligosaccharides in glycoprotein quality control. Current Opinion of Structural Biology. 15: 481-489.

Macchi, V., Snenghi, R., De Caro, R., and Parenti, A. (2002) Monolateral hypoplasia of the motor vagal nuclei in a case of sudden infant death syndrome. Anatomical Society of Great Britain and Ireland,

200: 195-198.

Smith, P., L., Myers, J., T., Rogers, C., E., Zhou, L., Petryniak, B., Becker, D., J., Homeister, J., W., and Lowe, J., B. (2002) Conditional control of selectin ligand expression and global fucosylation events in mice with a targeted mutation at the FX locus. Journal of Cell Biology. 158: 801-815.

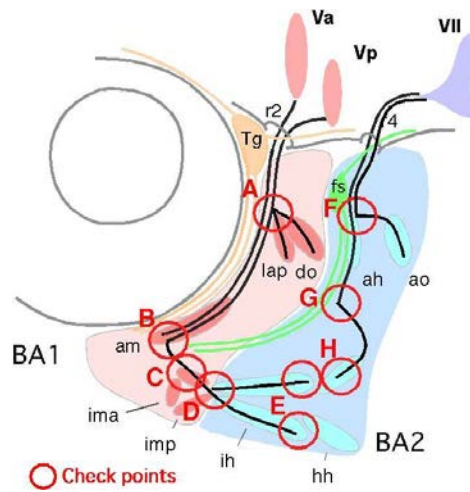
[III] ゼブラフィッシュ三叉運動神経細胞(第5脳神経)の発生に異常を示す突然変異体を用いた細胞分化および軸索進展機構の解析

(田中英臣、前田龍、小林恵実、佐藤涼子、佐藤美紀)

脊椎動物の初期発生において後脳に生まれる三叉運動神経細胞群(Va, Vp)は、顔面神経細胞(VII)とともに、第1鰓弓および第2鰓弓内の特定の経路を経て自身の標的筋肉へと投射する。

我々は、神経核の形成から軸索の誘導、標的筋肉への投射に至るそれぞれの発生段階を制御している分子機構の解明を目指して、鰓弓運動神経を可視化

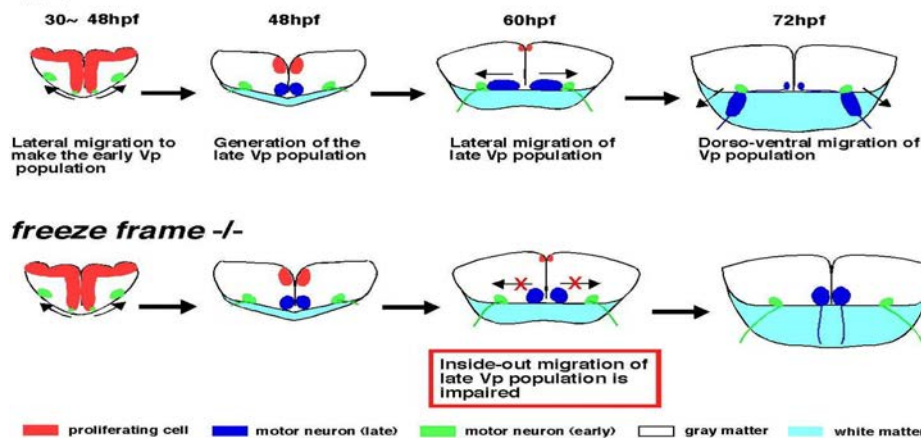
出来る Islet-1-GFP トランスジェニックシステムを用いた突然変異体のスクリーニングを行った。1816.5 ゲノムについて行ったスクリーニングにおいて、後脳内における三叉運動神経後核(Vp)の形成と、末梢におけるVpおよびVIIの軸索伸展過程の様々な段階で異常を示す突然変異体を10系統単離した。



III-1: 三叉運動神経後核の第3菱脳節内における細胞移動および分化に異常が認められるシステムの解析

三叉運動神経後核(Vp)は第3菱脳節(r3)内に発生する。野生型では受精後30時間目から受精後48時間目までに分裂細胞層の両側に初期のIslet-1陽性細胞集団が形成される(early population)。その後、受精後48時間目頃に後期のIslet-1陽性細胞集団が正中線近傍に生まれる(late population)。この後期の細胞集団は、内側から外側へと灰白質と白質の境界面を移動し、初期の集

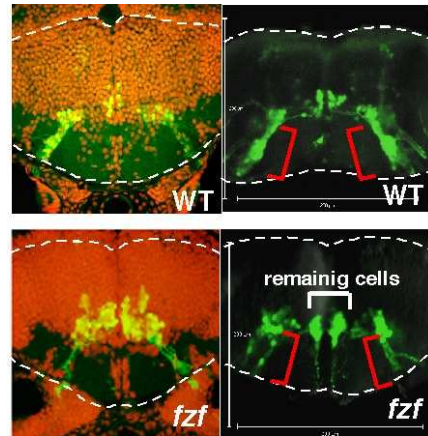
WT



団に達した後、移動方向を腹側へ転じ、受精後72時間目までに白質層の外側に初期の集団とともにVpを形成する。

III-1-1: freeze frame (*fzf*) 突然変異の形質

fzf では初期に誕生する三叉運動神経後核細胞(Vp)は正常に形成されるが、後期に生まれる細胞集団の内側から外側への移動が認められない。その結果、白質層内における Vp の形成が阻害されることが time-lapse 観察より明らかになった。

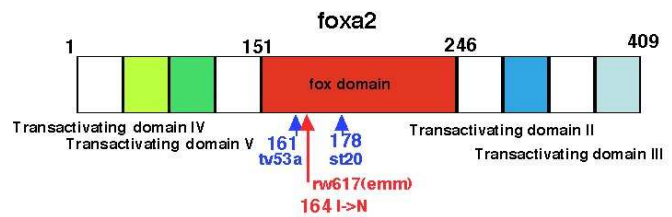
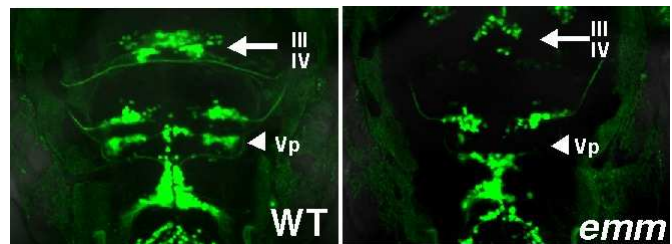


III-1-2: freeze frame (*fzf*) 原因遺伝子のポジショナルクローニング

補足資料参照(未公開)

emmental (*emm*) 突然変異

emm では、様々な程度で Vp の欠失が認められた。さらに、動眼神経(III)、滑車神経(IV)の形成も認められなかった。



*emm*は既報の系統である *monorail* の allele

であることが明らかとなった。

原因遺伝子は、LG17 上に存在する *foxa2* であり、floor plate, oligodendrocyte, serotonergic raphe neurons および III, IV, Vp の 分化に関与することが、Norton らにより報告されている (Development 132, 645-658 (2004))。しかし、*foxa2* の III, IV および Vp の発生および分化過程における役割は不明である。

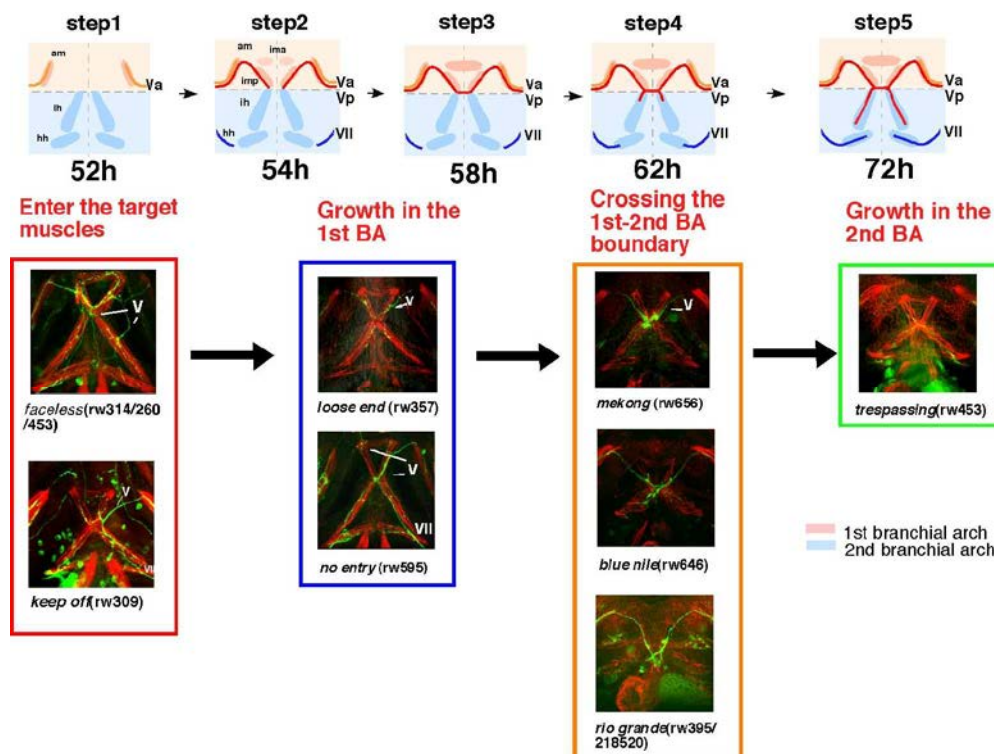
III-2:三叉運動神経および顔面神経の鰓弓内における軸索走行に異常が認められる系統の解析

野生型では、三叉運動神経(Va,Vp)および顔面神経(VII)の軸索は、それぞれ第1鰓弓および第2鰓弓内を感覚神経の軸索と共通の経路をたどり、背側から腹側へ向かって伸張する。その後、この共通の経路から分岐した運動軸索は、それぞれの標的筋肉へ向かって伸張を開始する。

我々は、運動軸索の伸張の各段階で特異的な異常が認められる変異系統群を単離することに成功した。

下顎部の標的筋肉上において運動軸索の走行に異常を示す系統は大きく4つのカテゴリーに分類された。

- 1) *faceless(fcl)*型の系統では、Vp および顔面神経(VII)の軸索の走行が標的筋肉にランダムに投射する。
- 2) *loose end (loe)*型の系統は、軸索が標的筋肉へ向かう経路は正常であるが、標的筋肉上の経路の途中で伸張が停止する。
- 3) *mekong(mkn)*型の系統では、Vp の軸索は第1鰓弓内にとどまり、第1鰓弓と第2鰓弓の境界を越えて第2鰓弓由来の標的筋肉へ投射する軸索が認められない。
- 4) *trespassing (tre)*系統では、標的筋肉に達した Vp の軸索は退縮し、本来 Vp が支配する領域に VII の軸索が第1鰓弓と第2鰓弓の境界を越えて異所性に伸張する。

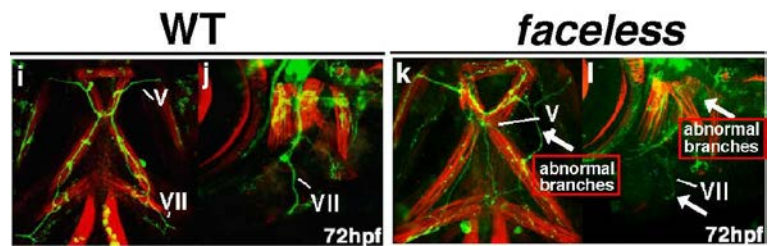


III-2-1: *faceless* (*fc*)

形質

fc では、Vp および VII の軸索が標的筋肉にランダムに投射する。

time-lapse 観察の結果、それぞれの鰓弓内における感覚神経の軸索と共通の経路から分岐した後に、defasciculation を起こし、個々の軸索がバラバラに標的へと投射することが明らかになった。



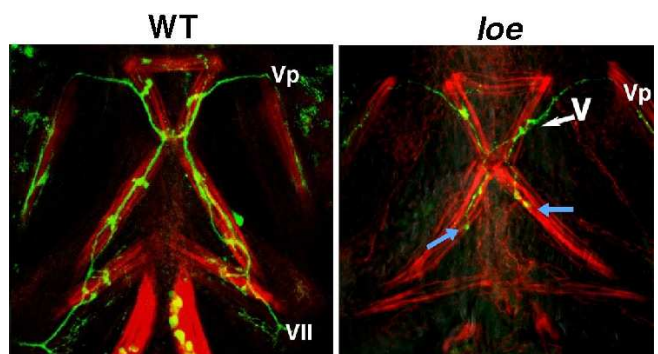
faceless (*fc*) のポジショナルクローニングと機能解析

補足資料参照 (未公開)

III-2-2: *loose end* (*loe*)

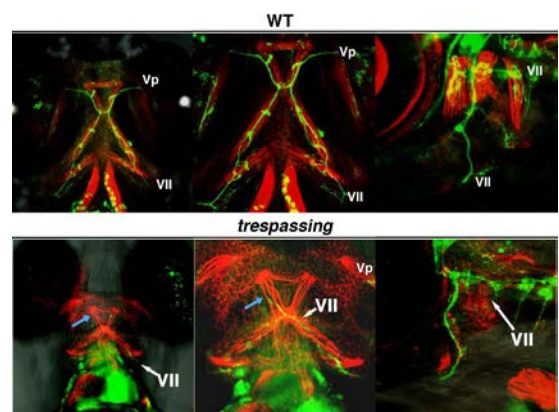
形質

loe では、Vp の軸索が標的筋肉へ向かう経路は正常であるが、軸索が標的筋肉上で伸張を止める。また、VII の下顎へ向かう軸索が認められない。これらの表現型からよりローカルなガイドンスに關与する分子機構への關与が予想された。



III-2-3: *trespassing* (*trp*)

trp では、標的筋肉に達した Vp の軸索は退縮し、本来 Vp が支配する領域に VII の軸索が第 1 鰓弓と第 2 鰓弓の境界を越えて異所性に伸張する。*trp* の原因遺伝子は LG22 上に存在する、これまでに機能について報告のない遺伝子であることが明らかになった。現在機能解析を行っている。

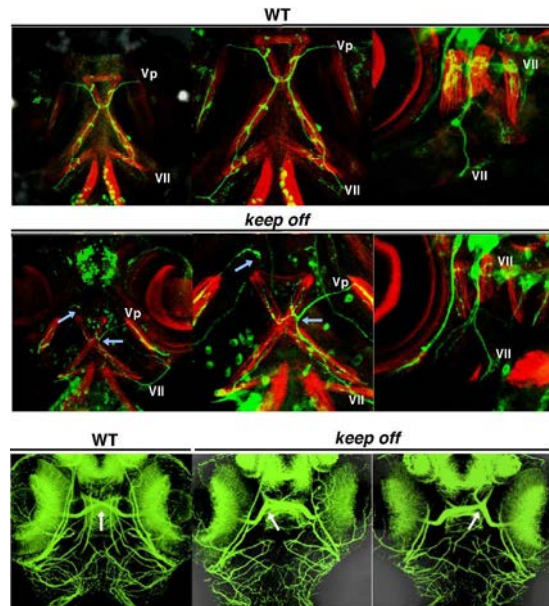


III-2-4: *keep off (kof)*

*kof*では Vp の軸索がが標的筋肉にランダムに投射する。

また、視交叉が正中線上ではなく、左右のいずれかに偏って形成される。

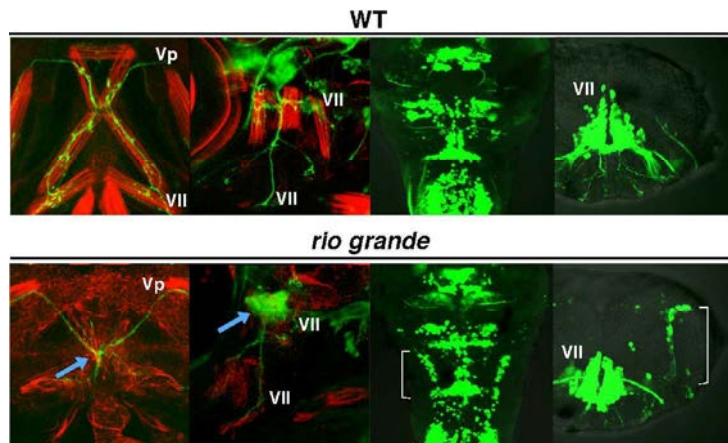
*kof*の原因遺伝子は、LG4 上に存在することが確認された。現在原因遺伝子の同定を進めている。



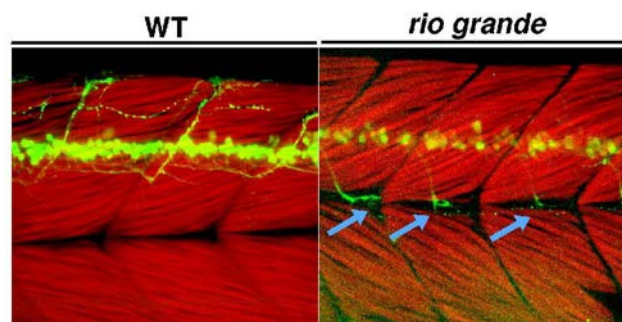
III-2-5: *rio grande (rio)*, *blue Nile (bln)*

*rio*では、Vpの軸索は第1鰓弓内にとどまり、第2鰓弓に伸張しない。しかし、この系統では下顎部の骨格および筋肉の発達も阻害されているので、それらの影響を受けている可能性が考えられる。

*rio*では他に、第2鰓弓の上鰓部および r4 から r6 の灰白質の外側部に異所性に Islet-1-GFP 陽性細胞が誘導される。



さらに、体幹部において背側の筋肉に投射する Islet-1-GFP 陽性の 2 次運動神経細胞の軸索が認められず、腹側に伸張する軸索が異所性に認められる。この軸索は myoseptum に達すると方向を転じ、後方へと



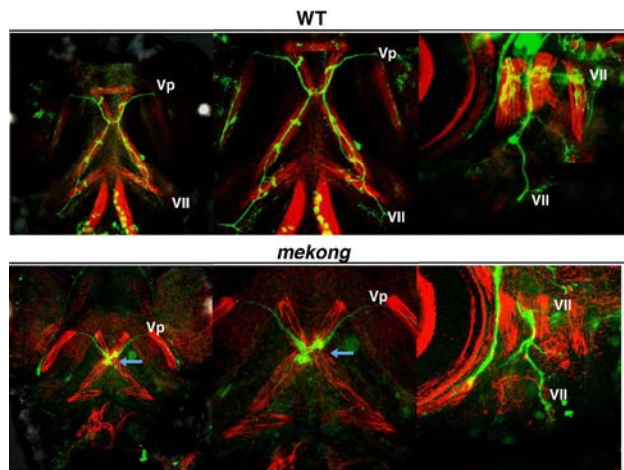
伸張する。

rio では 3 系統の allele (rw218, rw395, rw520) が単離されている。原因遺伝子は LG5 上に存在することが明らかになった。現在、原因遺伝子の同定を進めている。

bln の表現型は *rio* と同様である。このことは、*rio* と及び *bln* がこの表現型を司る同一のシグナル伝達系を構成していることを示唆している。*bln* の原因遺伝子は、LG14 上に存在していることが明らかになった。現在この遺伝子の同定を進めている。

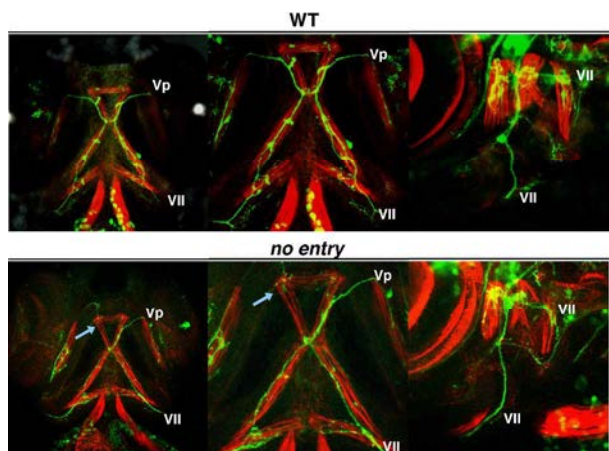
III-2-6: *mekong (mkn)*

mkn では、Vp の軸索は *rio* 同様、第 1 鰓弓と第 2 鰓弓の境界手前にとどまり、第 2 鰓弓に到達しない。しかし *rio* と異なり、下顎部の構造は野生型と同様に保たれている。*mkn* の原因遺伝子は、LG7 上に存在することが確認されている。現在この遺伝子の同定を進めている。



III-2-7: *no entry (net)*

net では、Vp の軸索が標的筋肉へ向かう経路は正常であるが、左右一方の軸索が標的へと伸長出来ない。現在原因遺伝子が存在する LG の検索を行っている。



3-2

サブテーマ名

鰓弓神経節の形成に異常を示す変異体 *nep* の原因遺伝子クローニング

担当

二階堂昌孝グループ(埼玉大学理学部生体制御学科)

研究実施内容及び成果(岡本グループ和田浩則、佐藤淳グループとの共同研究)

脊椎動物の頭部には、体の内外からの刺激を中枢へ伝えるいくつかの感覚神経節が存在する。その中で鰓弓神経節と呼ばれる神経節は、顔面神経節、舌咽神経節、迷走神経節を含み、味覚や触覚などの感覚刺激を伝達するほか、心臓の拍動や内臓の動きをモニターし、内部環境の恒常性を保つことにも関わっている、重要な神経節である。

これら3種の神経節は、発生の初期段階において1対の鰓弓プラコードから、内胚葉からの FGF などの分泌因子の刺激を受けて形成されると考えられているが、その後の分子カスケードに関しては明らかになっていない。また3種の神経節の identity の決定に関わる分子メカニズムについても未解明である。

本研究では、当研究チームの突然変異体スクリーニングで得られた、鰓弓神経節の形成不全突然変異体である *non-epibranchial* (*nep*) についてその原因遺伝子の同定を行い、その機能解析を通じて、鰓弓神経節の形成に関わる分子機構を明らかにすることを目的としている。

non-epibranchial (*nep*) の形質

nep 変異体の代表的な表現型は、その名が示すとおり、3つの鰓弓神経節が形成されないことである。右図 A, B は受精後2日目の野生型胚(B)、及び変異体胚(A)の鰓弓神経

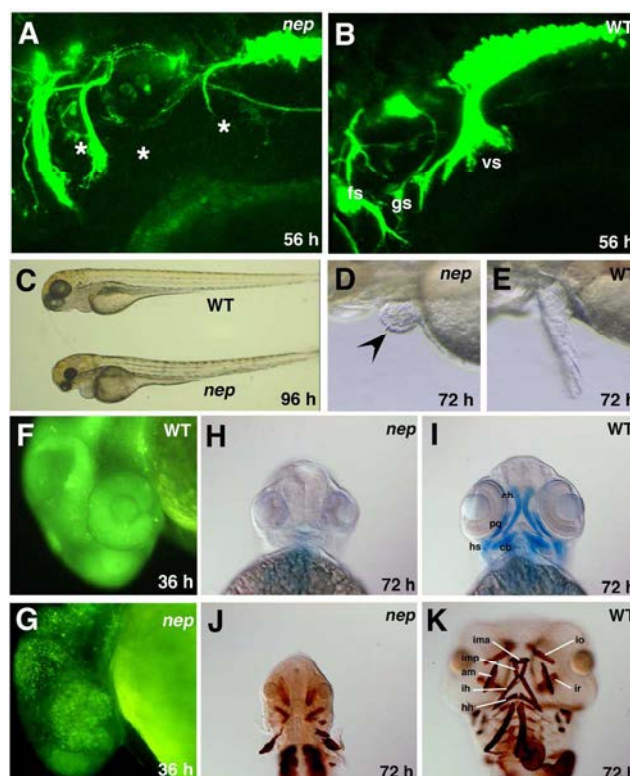


図1 *nep* 変異体の異常

節領域の蛍光顕微鏡像であるが、変異体胚では、顔面神経節 (fs)、舌咽神経節 (gs)、迷走神経節 (vs) の形成が認められない (asterisk で表示)。

またこのほかにも、受精後 36 時間程度から頭部や目の縮小が見られる (図 1C 上段の個体が野生型、下段の個体の変異体。写真は受精後 4 日胚)。

またさらに、受精後 3 日目以降に顕著に見られる胸びれの伸長についても、著しく抑制されている (図 1D が変異体、1E が正常個体。写真は受精後 72 時間胚)。

これら頭部や鰭の異常に関しては、アクリジンオレンジ染色によって多数の死細胞が検出されたことから、当該組織における細胞死が原因であると推測できる。

図 1F に正常個体、1G に変異個体の受精後 36 時間胚における頭部の染色像を示す。輝点で示される死細胞が変異個体の視蓋部や眼に多く認められる。また、顎部の筋・軟骨形成も、正常個体 (図 1I, 1K) に比べ変異個体 (図 1H, 1J) で著しく阻害されていた (図 1H, 1I は alcian blue による軟骨の染色、図 1J, 1K は筋肉を示す)。

またさらに鰓弓神経節の形成については、*neurogenin1* (*ngn1*) 及び *phox2a* をマーカーとして、*nep* の表現型が顕著となる受精後 48 時間胚において、その発現を検討した。*ngn1* については、変異体 (図 2A) では野生型胚 (図 2B) に比べ神経節の数は減少するものの、3 種の神経節の形成は正常に行われているようであった (図 2A, 2B において、f, g, v はそれぞれ顔面、舌咽、迷走神経節を示す。2C, 2D も同様。)。

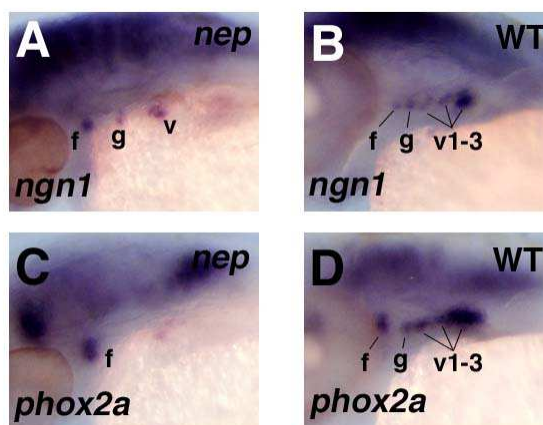


図 2 *nep* における分子マーカーの発現

一方 *phox2a* については、顔面神経節での発現は残るものの、他の神経節に関しては著しい発現抑制が認められた (図 2C 変異体、2D 野生型胚)。

ngn1 よりも *phox2a* の方がより分化段階の進んだ neuron マーカーであることも考え合わせると、*nep* 変異体においても、はじめは正常にプラコードが形成され神経節は分化するが、より後期の維持あるいは分化過程で異常が起きると考えられる。

non-epibranchial (nep) の形質のポジショナルクローニング

補足資料参照(未公開)

研究成果の今後期待される効果

今回の研究から、鰓弓神経節の形成に対するピリミジン合成系の関与が強く示唆された(補足資料参照)。また上述のように、ここでみられた異常は、タンパク質への糖鎖付加機能の異常に起因する、neural crest 細胞の異常による可能性がある。

これまで、鰓弓神経節の形成異常に関して、ピリミジン合成経路や糖タンパク質の寄与が報告された例はなく、今回の研究成果から、鰓弓神経節の形成に関わる分子機構の新たな局面の存在が示唆されたといえる。

特に糖タンパク質の動物発生における重要性については、すでに別の局面で示されており、それによれば、Wnt のような主要な細胞外シグナル伝達物質の受容体への提示や、Notch のリガンドへの応答性の調節など、発生現象の制御に欠かせない、きめ細やかなシグナルの調節に関わっていることが知られている。

鰓弓神経節の発生において、本当に糖タンパク質の形成が関与しているのか、またその関与の仕方はどのようなものであるのかが、他の実験動物での実験も含めた解析が今後の興味の焦点となる。

3-4

サブテーマ名

鰓弓と色素細胞分化異常を示すゼブラフィッシュ突然変異 *epehmeral* の解析

担当

佐藤淳グループ(東京科学技術大学)

研究実施内容及び成果(岡本グループ佐藤美紀との共同研究)

補足資料参照

3-5

サブテーマ名

ゼブラフィッシュ神経系正中構造の形成異常を示す突然変異の解析

担当

川上厚志グループ(東京大学、東京工業大学)

研究実施内容及び成果(岡本グループ野島康弘、豊田グループとの共同研究)

神経系では、異なった多種の神経細胞が正しく形成・配置されて、はじめて正しい神経同士の結合と神経機能を司ることができる。運動神経やその周囲の介在神経などの背腹軸に沿った神経細胞の誘導には、発生過程で脊椎動物の正中に形成される中胚葉組織である脊索および底板から放出される分泌性シグナル分子であるヘッジホッグと、受容細胞でのシグナル伝達の調節機構を通じた反応機構が重要な働きをしていることが、様々の発生学的および分子遺伝学的研究によって明らかにされている。

また、ヘッジホッグシグナル分子は神経系に作用した場合には、種々の腹側の神経細胞を誘導するが、中胚葉組織である体節に作用した場合には、遅筋や筋パイオニア細胞などの筋肉細胞や骨芽細胞を形成させることができる。さらに興味深い点として、ヘッジホッグシグナルは発生初期において重要な作用をするだけでなく、様々の内臓器官や肢芽における前後軸のパターン形成にも必須のシグナルであり、成体でも多くの組織・器官の維持に関わっていることが明らかにされている。

皮膚・筋肉などに起こる幾つかのタイプのガンの発症には、ヘッジホッグシグナルの制御異常が原因となっている。ヘッジホッグシグナルは、Bmp、Wnt、Notch など、生物進化の上で保存された重要なシグナル分子と並んで動物の組織・器官の形成・維持に欠くことのできない分子であるが、細胞に対してきわめて高い指令能力を持っているため、その作用は何重もの制御機構によって厳密に制御されていると考えられる。

近年の分子遺伝学の進歩によって、ヘッジホッグシグナル伝達に関わる様々の分子が次々と明らかにされているが、これら分子的知識の進歩にもかかわらず、生体内部で起こるダイナミックな現象の分子的説明はまだ不十分であり、詳細な生体内調節機構の解明が待たれている。

我々はヘッジホッグシグナルの調節機構を探るために、ゼブラフィッシュを用いた発生遺伝学的な解析を進めてきた。ゼブラフィッシュではヘッジホッグシグナルの異常と考えられる変異体が多数単離されており、これらの解析からヘッジホッグシグナルの調節に関わる分子やそれらの働きを、個体レベルで明らかにすることができると期待されている。

本研究では、ドイツで行われた大規模変異体コレクションおよび理研・岡本グループによって行われた国内での大規模変異体コレクションで、それぞれ単離されてきたゼブラフィッシュ変異体である *you* の解析を行い、この変異体で欠損している分子の作用が、ヘッジホッグシグナル伝達が別のシグナルとクロストークを行う上で必要な分子であることを明らかにした。

you 変異体では、他の幾つかのヘッジホッグシグナル異常ゼブラフィッシュ変異体と同じく、明らかなヘッジホッグシグナルの低下が見られる。しかし、脊索に接する神経管底部では欠損の程度が低いのに比べ、脊索から遠距離にある体節の筋肉細胞の形成や側線神経の神経軸索の誘導には強い異常が見られる。このことから、ヘッジホッグシグナルの拡散など、遠距離のヘッジホッグシグナル調節機構の異常であると考えられた。

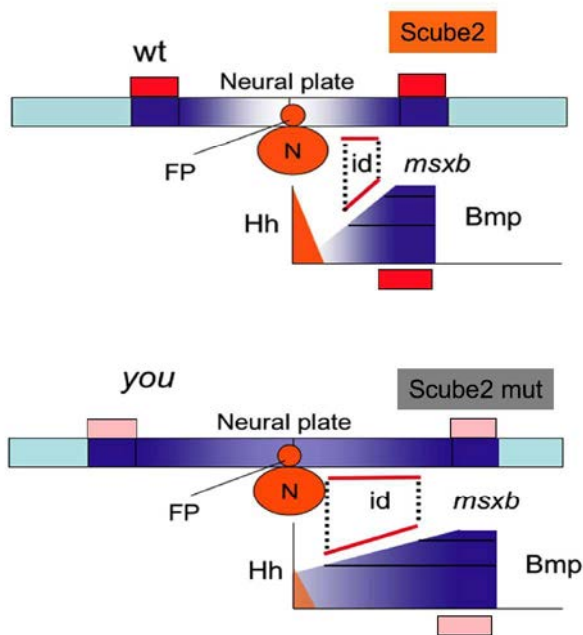


図1 Scube2 の作用機構モデル

野生型と *you* 変異体の神経板の横断面を図示している。神経板背側と表皮に豊富に存在する Bmp シグナルは Scube2 の存在によって作用範囲が制限され、神経板腹側でのヘッジホッグシグナル (Hh) 活性化を妨げないようになっていると考えられる。Scube2 機能を失った *you* 変異体では、背側の Bmp シグナル自身のレベルは変わらないが、その作用範囲が広がり、腹側での Hh シグナルの活性化が阻害される。

id, intermediate domain (神経板の中間領域)

FP, Floor Plate (神経底板)

msxb, 神経管背側に発現する遺伝子マーカー

変異の染色体上へのマッピングとそれに続くポジショナルクローニングによって *you* 変異体原因遺伝子を明らかにしたところ、*you* 遺伝子は9つの EGF リピートを持つ細胞外マトリックスタンパク Scube2 をコードしていることが明らかになった。

しかしながら我々の予想に反して、*you/scube2* 遺伝子は神経管の背側にのみ局在して発現しており、ヘッジホッグ分子の分布とはほとんど重ならなかった。従って、Scube2 はヘッジホッグ分子の拡散調節よりはむしろ、背側から長距離に作用する何らかのヘッジホッグシグナル阻害分子を抑制するのではないかと考えられた。

さらに、変異体の詳細な解析を重ねた結果、このような分子として背側の正中や表皮に由来する Bmp がヘッジホッグ阻害シグナルであることを見いだした。我々は、Scube2 欠損下での Bmp シグナルが正常よりも長距離に作用するようになって、その結果ヘッジホッグシグナルの伝達を妨げることを示した(図1)。

このように、細胞外マトリックス分子 Scube2 は、背側神経管や表皮に存在する Bmp によるヘッジホッグ阻害作用を抑制することによってヘッジホッグシグナル活性化を制御していることが明らかになった。

一方で我々の行った解析の結果はさらに、Scube2 自身は Bmp 分子と結合することはなく、別の分子を仲介として作用することを示していた。このような仲介分子を同定するため、酵母菌を用いた Two Hybrid スクリーニングを行い、Scube2 タンパクと結合する分子の探索を行った。

この結果、約 1,200 万個のクローンのスクリーニングから、繰り返し単離される15種の cDNA 断片が

これまでに得られている。現在、これらの遺伝子の解析が進行中である。

これまでに、ゼブラフィッシュやショウジョウバエを用いたヘッジホッグシグナル変異体の研究から、新規シグナル調節分子も次々と発見され、それら機能や相互の繋がりも解明されてきている。

これらは、ヘッジホッグシグナル分子の細胞外拡散に関わるヘパリン硫酸プロテオグリカン合成酵素や、細胞内でのシグナル伝達に関わるPatched、Smoothed、Fused、Costal2、Suppressor of Fused、Dzip1、Gliなど直接ヘッジホッグシグナルを調節する分子群である。

これらに対し、本研究で明らかとなったBmpシグナルと細胞外マトリックスScube2を仲介とした調節機構は、間接的なヘッジホッグシグナルの調節機構としてはおそらく最初の例である。

このような阻害的なBmpシグナルは発生過程などでしばしば見られるが、それらは細胞外マトリックスや結合タンパクを介した調節機構によって抑制されて、必要な場所とタイミングで他のシグナル分子の作用を可能にするファインチューニングメカニズムのひとつと考えられる。

研究成果の今後期待される効果

細胞外マトリックス分子を含む細胞外環境は細胞にとっての単なる足場や糊としてだけでなく、シグナル分子の制御やシグナルそのものであることが、近年多くの研究によって示唆されている。

例えば、ラミニンやファイブロネクチン、インテグリンなどは発生中に重要なシグナル分子として働くことが示されているし、ヘパリン硫酸プロテオグリカンはシグナル分子の作用範囲を決めていることが遺伝学的に明らかにされている。

本研究のゼブラフィッシュ変異体 *you* の研究成果は、Bmp シグナルがヘッジホッグシグナル活性化に影響を与えることを明瞭に示したが、そのような阻害的な相互作用を抑制する上で、Scube2 の様な細胞外マトリックス分子が重要な働きを持っていることが明らかになった。

これは、細胞にとって都合の良い細胞外の環境を作り出すようなメカニズムと考えられる。この結果は、今後さらに、相互作用する分子の同定などによって、細胞外マトリックスがアクティブにシグナル分子の作用範囲をコントロールするメカニズムの理解へと繋がっていくことが期待される。

ヘッジホッグシグナルも Bmp シグナルも、発生中だけでなく、発生後の組織の維持、再生、さらにはガンの発症にも重要な働きをしていることから、これらのシグナル調節機構の理解は医学的にも非常に高いニーズがある。特に、細胞外マトリックスのシグナル伝達における役割は、今後の創薬のターゲットとしても応用が期待される。

研究実施内容及び成果

ゼブラフィッシュ You 変異体の原因遺伝子 (You 遺伝子) を同定するために、候補領域をカバーする BAC/PAC クローンの塩基配列をショットガン法により決定した。すなわち、物理的剪断力を利用し、ランダムに DNA を断片化し、その両末端配列を決定後、決定した配列の相同性をもとに結合・編集作業 (アセンブル) を行うことにより配列決定を行った。その後、完成データ (高精度配列) に向けて精度の低い領域やギャップ領域を種々の方法を用いて仕上げた (Phred/Phrap/Consed プログラムを使用)。

単離されたクローンのうちの1つである DKEY-188F22 クローンの高精度な塩基配列を決定した (Accession No. AP007256)。配列決定された BAC クローン上には、遺伝子予測プログラム (GenScan) により 8 個のタンパク (ORF) をコードしている遺伝子が検出された。これらの遺伝子について野性株と You 変異体で配列を比較した結果、scube2 と呼ばれる遺伝子が原因遺伝子であることが明らかとなった。

3-7

サブテーマ名

側線神経発生の遺伝学的解析

担当

東海林互グループ (東北大学)

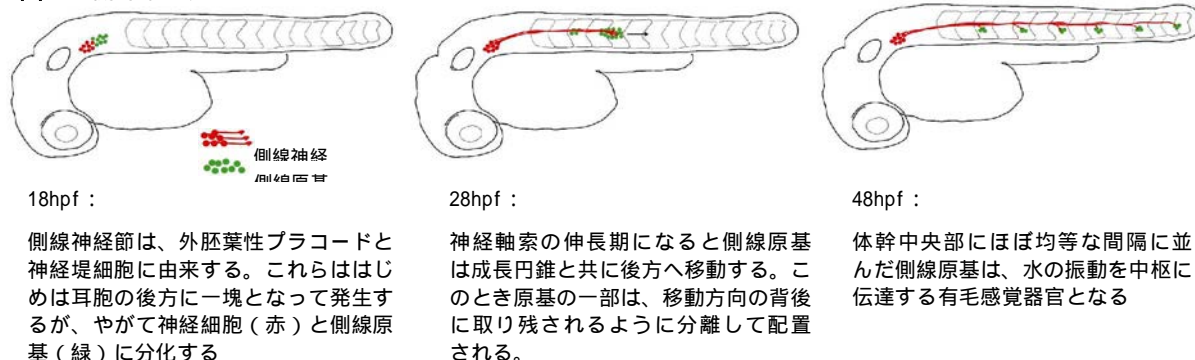
研究実施内容及び成果 (岡本グループ、佐藤美紀、野島康弘との共同研究)

側線は体表近くの水の振動を検知する水棲動物に特有の感覚神経系であり、その神経軸索は体表付近を耳の後ろから尾鰭まで走行する魚類では最も長大なものである。側線系の発生過程の特徴として、神経軸索先端部の成長円錐が側線原基を伴って移動するというユニークな点があり(図1)、古くよりその意義が問われている。

神経成長円錐に随行する側線原基は、将来ニューロマストと呼ばれる有毛感覚器に分化する前駆細胞から構成される。これは見方を変えれば、側線神経がシナプスを作る標的にあらかじめ到達しており、標的細胞の移動に伴って神経軸索が追従すると解釈することも可能である。

本研究では側線の発生に異常をきたす新規の突然変異体を解析することにより、側線神経が側線原基を伴って移動することの機能的意義を理解しようと試みた。

図1 側線系の発生



1. 側線神経の伸展経路が大きく逸脱する変異系統(*rw322:walk off*)の解析

*walk off*は側線神経の伸展経路および側線原基の移動経路が大きく逸脱する変異系統である。

それぞれの移動過程では神経成長円錐は経路を取り囲むように発現する反発因子 Sema3A によって、一方で側線原基は経路に沿って発現する誘導因子 SDF-1 によって、それぞれ移動経路が制御される(図2)。

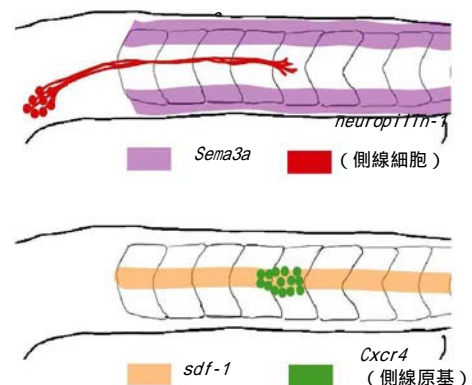


図2 側線神経と側線原基の移動経路を定める分子

これに対し *walk off*変異体では *sema3A*・*sdf-1*の発現パターンがともに異常であり、このために伸展および移動経路が逸脱するのである。

興味深いことに成長円錐と側線原基は正常の経路からどれだけ大きく逸脱してもなお挙動を共にしており、両者の結合の堅固なことが推察された。こうして成長円錐と側線原基が挙動を共にし、かつそれぞれが独立に移動のシステムを保持することは、一方のガイダンス・シグナルが失われた場合にもう一方がバックアップすることが可能になる点で有利であるといえる。

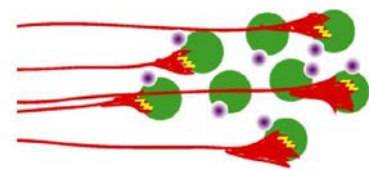
2. 側線神経と側線原基が解離する変異系統(*rw634*, *rw679:shane*)の解析

shane は本来なら挙動を共にする側線神経と側線原基が、移動の途上で離れてしまう変異系統である。

変異体では神経と離れた側線原基が、なおも全く正常に移動してニューロマストに分化するのに対して、側線原基から離れた神経はその場で伸長を停止しやがて変性する。

すなわち側線原基の移動には側線神経を必要としないが、側線神経の軸索伸長にはその成長円錐が側線原基と同調して移動することが重要と考えられた(図3)。

図3 側線原基と成長円錐が同調して移動することは側線神経の伸長に必要である



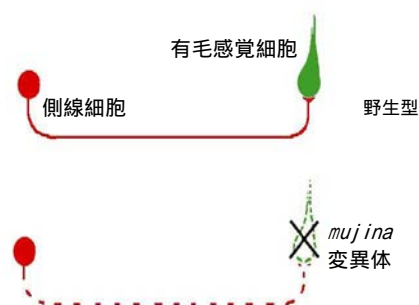
3. 側線神経が変性する変異系統(*rw279:mujina*)の解析

mujina 変異胚において、側線神経は側線原基と共に一旦は正常な経路で伸長する。しかしながら受精後2日目に側線原基から有毛感覚器への最終分化が不良になり、これと時を同じくして神経軸索が変性・消失する。

このような標的器官の消失に伴う末梢神経軸索の変性・消失は他のモデル生物でも知られており、それらはシナプス形成による電気的興奮や標的器官に由来する神経栄養因子が神経軸索の維持に必要なためと考えられている。

mujina 変異体の表現型は、側線系において一旦は完成した神経軸索が、同様の機構により維持されることを予測させるものであった(図4)。

図4 *mujina* 変異体では側線原基から有毛感覚細胞への分化異常があり、同時に神経軸索が変性する



<ポジショナルクローニングの現状と詳細>

補足資料参照(未公開)

<他の類似研究との比較>

以上の3種の変異系統の解析から、側線神経が側線原基と共に移動するユニークな発生プロセスについて、

- 1) 移動経路の選択をバックアップする、
 - 2) 軸索伸長に必要な因子を付与する、
 - 3) 軸索の維持に必用な有毛感覚器官との連絡を確かにする、
- 3点の機能的な意義が示唆された。

最近、ドイツのニウスライン・ホルハートらのグループは、側線系の発生においては側線原基の移動が主体であり、側線原基が神経軸索を牽引することによりその伸長方向を定めるという軸索ガイダンス・モデルを提唱している。

本研究はこれにさらに加えて、神経軸索の伸長および維持のために、側線原基との協調した分化プロセスが必要であることを新たに示すことができたといえる。

研究成果の今後期待される効果

今後は上記した仮説を移植実験などによって証明すると同時に、変異体で異常を引き起こした原因遺伝子を同定する。さらに将来的には、神経軸索の伸長および維持を担う因子の本体を特定することによって、本研究が神経損傷および神経変性疾患に対する新たな治療への萌芽的なアプローチとなることが期待できる。

研究実施内容と成果

背景

網膜は脳のもとになる神経板から発生し、そこには視細胞を含む6種類の神経細胞と1種類のグリア細胞が分化し、視覚情報の伝達を担う神経回路が形成される(図1A)。

このように網膜には脳の他の領域に比べてシンプルな神経回路が形成されることから、神経幹細胞から多様な神経細胞が生まれ出され、機能的な神経回路の構築に至るまでの制御メカニズムを研究するよいモデル系となっている。

発生初期には網膜は網膜幹細胞と呼ばれる多分化能を持った細胞から構成され、これらの細胞は細胞分裂を繰り返しながら増殖している。その後、網膜幹細胞の一部は細胞分裂の周期から出て、神経細胞として特異化される(図1B)。

今までの多くの研究から、網膜神経細胞の運命決定は細胞分裂の系譜によらないことが明らかにされており、おもに細胞間の相互作用によって網膜幹細胞の多分化能が制限され上記の6種類の神経細胞と1種類のグリア細胞が分化すると考えられる。しかし、その分子メカニズムの詳細はまだ不明である。

また、脊椎動物を通して、神経細胞分化は網膜中心部から始まり、辺縁部へ向けて波が伝播するように広がっていくことが知られている。この現象は、網膜における神経細胞分化が空間的にも厳密にコントロールされていることを示唆しているが、その分子基盤に関しても全く不明であった。

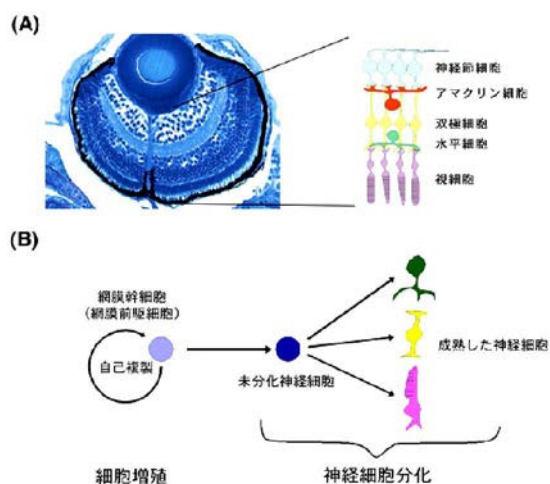


図1 (A) ゼブラフィッシュの3日目網膜 (B) 網膜幹細胞から神経細胞への分化過程

我々は網膜の基本的な構造が魚からヒトまで保存されていることに着目し、魚類であるゼブラフィッシュを用いて網膜における神経細胞分化および回路形成について研究してきた。

我々は以前、ゼブラフィッシュ網膜における神経細胞分化は眼柄との境界部から始まり網膜全体へ広がっていくこと、眼柄と網膜の境界部を物理的に除去すると網膜での神経細胞分化が起きないことから、網膜における神経細胞分化の開始は眼柄からのシグナルによって担われている可能性を示唆してきた (Masai et al., 2000 Neuron 27, 251-263.)。

また、網膜における神経細胞分化の伝播には分泌因子である Hedgehog (Hh) を介したシグナル経路の活性化が必要であることも明らかにしてきた (Masai et al., 2005 Development 132, 1539-1553.)。

最近、ドイツの他の研究グループによって、神経細胞分化の開始を担う眼柄からのシグナルの実体は繊維芽細胞成長因子 (Fibroblast growth factor (FGF)) である可能性が報告されている (Martinex-Morales et al., 2005 Dev. Cell 8, 565-574.)。これらの結果から、ゼブラフィッシュ網膜では FGF によって神経細胞分化が開始され、Hh シグナル経路によって網膜全体へ伝播する図式が明らかになった (図2)。

研究実施内容と成果

(i) 網膜分化異常を示す突然変異体のスクリーニング

本研究では、上記の網膜における神経細胞分化の制御を明らかにするために、研究代表者である岡本博士らと共同で、ゼブラフィッシュの大規模な突然変異体のスクリーニングを実施した。ここでは

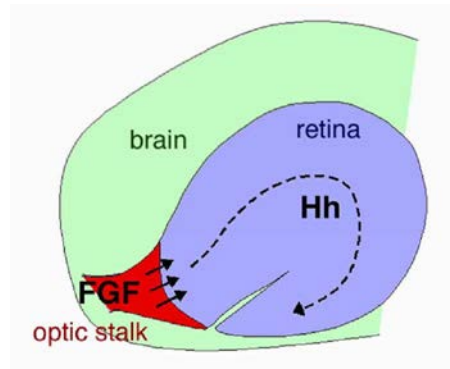


図2 ゼブラフィッシュ網膜での神経細胞分化は眼柄 (optic stalk) からの FGF によって開始され、Hh 経路を介して網膜全体へ伝播する。

染色体の複数回スキャンするのに匹敵する 1817 ゲノムに化学変異剤で突然変異を導入し、第三世代でホモ接合体の胚を作製し、網膜の神経回路網を抗チューブリン抗体で染色可視化することで、354 系統の網膜分化に異常を示す突然変異体を同定した。

それらのすべてについてプラスチック切片を作成することで、詳細な網膜の形態観察を行い、突然変異体を表現型により分類した。その結果、網膜層構造に異常を示す変異体を 322 系統、視覚行動に異常を示す変異体を 14 系統、水晶体の形成に異常を示す変異体を 12 系統、眼杯の形態に異常を示す変異体を 6 系統に分類することができた。

この中から、より特異的な表現型を示す 45 系統を解析のため選抜した。

(ii) 網膜における増殖から分化へのスイッチが異常になる突然変異体の解析

上記の突然変異体の中から、網膜において神経細胞分化が起きずに網膜幹細胞が過剰に増殖する変異体として *ascending and descending (add)* を同定した。

受精後 2 日目の野生型網膜では網膜細胞のほとんどは神経細胞へと分化して層構造が形成されているが、*add* 変異体では網膜細胞が異常に増殖し、その結果、網膜細胞上皮は眼杯の中で折れたたまる表現型を示した(図3)。

add 変異体細胞を野生型網膜へ移植したキメラ網膜を

つくと、まわりの野生型細胞は増殖を停めて神経細胞へ分化しているにもかかわらず *add* 変異体細胞は細胞自律的に増殖し続ける。

このことから、*add* 変異の責任遺伝子は網膜幹細胞が増殖から分化へスイッチするのに必要な蛋白質をコードすることが強く示唆された。

我々は *add* の責任遺伝子をクローニングし、それがヒストン脱アセチル化酵素 1 (HDAC1) であることを明らかにした (Yamaguchi et al., 2005 Development 132, 3023-3043)。ヒストン脱アセチル化酵素は様々な転写抑制因子と複合体を形成し、その標的遺伝子上のヒストンを脱アセチル化することで、クロマチンを凝縮させ、標的遺伝子の転写を抑制する酵素である(図4)。

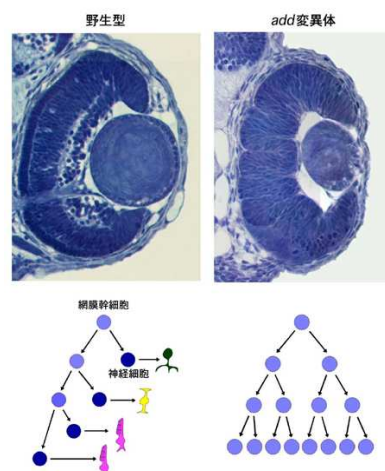


図3 *add*変異体の網膜。*add*変異体では網膜幹細胞が増殖を続け、神経細胞へ分化しない。

我々は、*add*変異体網膜で、増殖や細胞分化に関わる様々なシグナル経路を調べた結果、古典的 Wnt シグナル経路と Notch シグナル経路が抑制されず、恒常的に活性化していることを見出した。

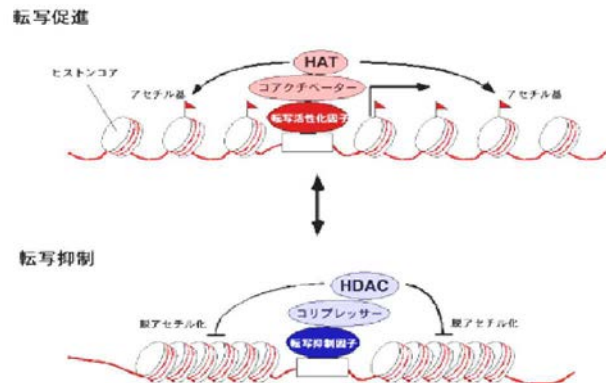


図4 HDAC1 と転写抑制

古典的 Wnt シグナル経路が活性化された場合、細胞内の β -catenin が安定化され核に移動し、転写因子である Tcf/Lef と相互作用して、細胞増殖を促進するサイクリン D1 の転写を活性化する。

Tcf/Lef は HDAC1 とも相互作用し、その場合標的遺伝子の転写が抑制されることが報告されている。

実際に *add*変異体ではサイクリン D1 の発現は脱抑制しており、HDAC1 は β -catenin と競合することで、Wnt シグナルの閾値を決めるモデルが考えられた(図5)。

我々は、活性化型の β -catenin をゼブラフィッシュ網膜細胞に発現させた場合、*add* 変異体と同様に網膜幹細胞の過剰な増殖が起こること、さらにこの β -catenin の増殖促進効果は HDAC1 の共注入することで抑制できることを見出した。これらのデータは上のモデルを支持する。

一方、Notch は膜蛋白質をコードし、リガンドである Delta と相互作用することで、その細胞内ドメイン (Notch intracellular domain: NICD) が切り出され核に移行する。NICD は転写因子である CSL と複合体をつくり、神経細胞分化を抑制する bHLH 型転写因子 Hes の遺伝子発現を活性化する。Notch が活性化されない場合、CSL は HDAC と相互作用し、標的遺伝子の転写を抑制することが報告されている。

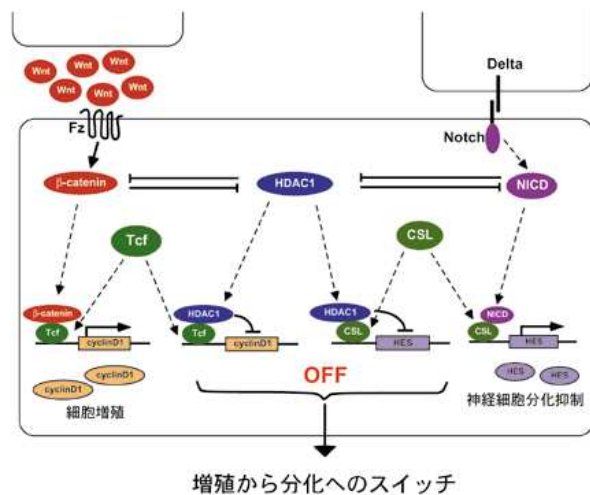


図5 HDAC1 の Wnt と Notch 経路の抑制モデル

add 変異体では Hes の発現が著しく活性化しているが、この発現は Notch シグナルを阻害すると抑制された。このことから、HDAC1 は NICD と

競合することで、Notch シグナル経路の閾値を決めることが示唆された(図5)。

また興味深いことに *add* 変異体において Notch 経路を遮断すると神経細胞分化だけでなく、網膜幹細胞の過剰な増殖も部分的であるが抑制した。このことは、Notch シグナル経路は神経細胞分化を抑制するだけでなく、積極的に細胞増殖も促進することを示唆する。

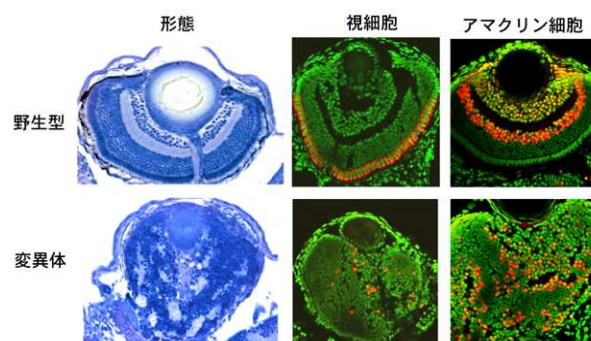
この細胞増殖に対する Notch の必要性は、Wnt シグナル経路を強く活性化した場合には見られず、Wnt 経路の活性化が弱い場合のみ現れることが明らかになった。これらの結果から、Notch 経路は Wnt 経路を補足する形で、細胞増殖の維持に働くと考えられる。

以上の研究から、ゼブラフィッシュ網膜において、古典的 Wnt シグナル経路と Notch シグナル経路は細胞増殖を促進し神経細胞分化を抑制すること、HDAC1 はこれらの2つのシグナル経路を抑制することで、分化へのスイッチとして機能することが明らかになった。

我々の以前の研究から、Hh シグナル経路は神経細胞分化の伝播を担うことが示唆されているが、*add* 変異体細胞で Hh 経路を活性化しても神経細胞分化はレスキューできない。このことから、Hh 経路は HDAC1 の上流または並列で働くと考えられる。

網膜の層構造形成に異常を示す突然変異体の解析

上の HDAC1 を介したメカニズムで神経細胞が生まれた後、網膜内を基底膜側へ移動し、6種類の神経細胞と1種類のグリア細胞へと分化し、最終的に層構造を形成する(図1A)。



しかし、網膜層構造の形成を制御する分子メカニズムはまだ不明である。

図6 網膜構造が乱れる突然変異体の表現型

我々は、ゼブラフィッシュ大規模突然変異体のスクリーニングにより、各神経細胞は正常に分化するが、層構造が形成できない突然変異体を8系統(*rw95*, *rw161*, *rw170*, *rw267*, *rw310*, *rw407*, *rw464*, *rw707*) 同定した。

rw95 変異体はもっとも表現型が弱く、網膜神経節細胞層とアマクリン細胞層が部分的に融合する表現型を示した。他の変異体では網膜神経上皮の接着帯が崩壊し、本来網膜上皮の頂端部(アピカル)側に位置する分裂細胞が網膜の内側へ散らばってしまい、各々の網膜神経細胞は混在して分化する表現型を示した(図6)。

これらの変異体は網膜細胞の極性や接着帯の確立に必要な因子をコードする可能性が強く示唆された。これらの変異座を染色体上にマップしたところ、既に他の研究グループで同定されていた *parachute (pac)*, *nagie oko (nok)*, *mosaic eyes (moe)*, *oko meduzy (ome)*と一致することが示唆された (*pac*: rw95, rw707; *nok*: rw161, rw464; *moe*: rw170, rw310; *ome*: rw267, rw407)。

さらに、これらの変異体を取り寄せ、我々の変異体との相補性試験を行った結果、新たなアレルであることが明らかになった。

*nok*と*ome*については、他のグループにより、責任遺伝子のクローニングがなされ、それぞれ membrane-associated guanylate kinase (MAGUK)ファミリーに属するショウジョウバエの Stardust 相同蛋白質と FERM (for4.1protein, ezrin, radixin, and moesin)ドメインをもつ新規蛋白質であることが報告された(図7)。

ショウジョウバエ胚の上皮において、Stardust は Crumbs と複合体を形成し、Par3/Par6/aPKC 複合体と協調して、細胞の頂端部側の極性および接着帯の維持に働くことが明らかになっている。

Nok でも網膜細胞の極性と接着帯の形成に異常を示すことから、*Nok* は Stardust と相同な機能を持つことが示唆された。

ome 変異体や *moe* 変異体の網膜では *nok* と同様に接着帯が崩壊し、*Nok* の局在も異常になる (Wei and Malicki, 2002 Nat. Genet. 31, 150-157.)ことから、*Moe*と*Ome* は *Nok*と同じ経路で働くと考えられる。

我々は、当時責任遺伝子の報告がなかった *pac* 変異体に焦点をあて、その責任遺伝子をクローニングした結果、N-cadherin であることが明らかになった(図7)。

N-cadherin は接着帯を構成する膜蛋白質で、細胞内では カテニンとの相互作用を介してアクチン繊維と結合し、カドヘリンリピートを持った細胞外ドメインを介して N-cadherin 間で相互作用し細胞の接着に働く。*rw95*では N-cadherin の細胞外にある EC4 ドメインにアミノ酸置換が起きており、一方

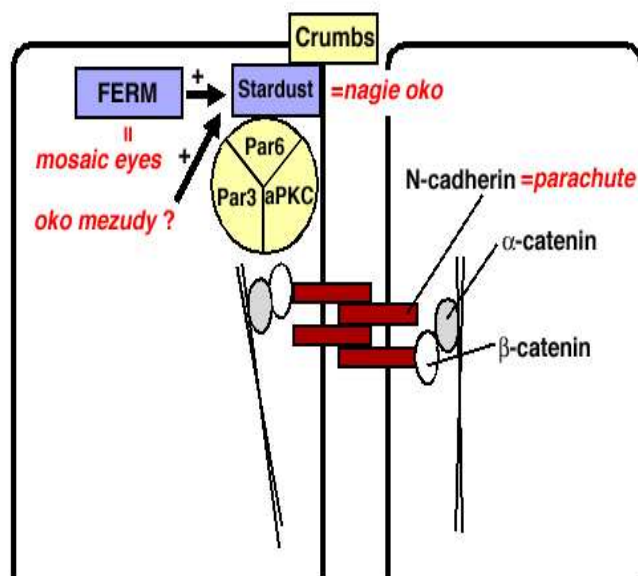


図7 ゼブラフィッシュ網膜層構造変異体と細胞極性制御因子との関係

*rw707*では EC4 ドメインにナンセンス変異が起きていることが明らかになった。

ゼブラフィッシュの胚細胞を用いた cell-mixing-assay により、*rw95* の細胞では細胞接着が野生型に比べて低下しているものの存在することが示され、*rw95* は hypomorph のアレルであると結論した。我々のこれら2つのアレルを用いて網膜の表現型を解析し、N-cadherin が接着帯の維持、アマクリン細胞の樹状突起形成、眼裂の融合、水晶体の繊維化、網膜神経節細胞の軸索伸長など網膜分化の多くのステップに必要であることを明らかにした (Masai et al., 2003 Development 130, 2479-2494.)。

マウスにおいても N-cadherin の突然変異体が作製されているが、心臓形成の異常によって早期に致死になるため網膜の表現型を調べることができない。過去には培養した網膜に N-cadherin の機能を阻害する抗体を作用させた実験があるが、今回の研究は脊椎動物網膜における N-cadherin の機能を個体レベルで検証した最初の例である。我々を含めた上記の突然変異体の解析から、網膜の層構造形成には初期の網膜神経上皮の極性の確立が重要であることが明らかになった。

(iii) 網膜において神経細胞死を起こす突然変異体の解析

多細胞生物の発生では細胞分化に異常が生じた場合、細胞自身が自爆死(アポトーシス)を起こし取り除かれることが知られている。このようなアポトーシスを介した異常回避のメカニズムは機能的な回路を構築する神経系では特に重要と考えられるが、分化過程の細胞がどのように異常をモニターするのか、アポトーシスを誘導する異常の閾値はどのようにセットさせるのかは全くわかっていない。我々はこの問題に答えるために、ゼブラフィッシュの網膜において神経細胞が分化途中に選択的に細胞死を起こす突然変異体を探索した。

その結果、*pinball eyes (piy)*, *helmet*, *sun glasses*, *rw564* の4系統の変異体を同定した。ここでは *piy* に関して、表現型の解析を行った。

piy 変異体では、網膜幹細胞は正常に細胞分裂を続けるにも関わらず、神経細胞は生まれるとすぐにアポトーシスを起こす(図8)。

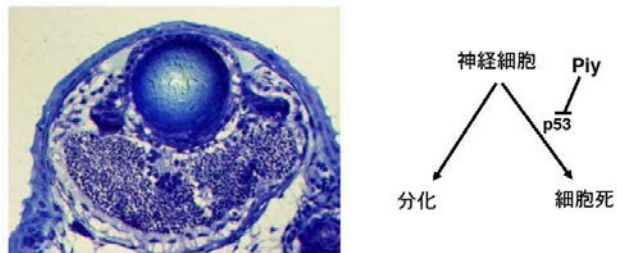


図8 (左) 3日目における *piy* 変異体網膜
(右) *Piy* は p53 依存性のアポトーシスを抑制する

細胞移植の実験から、*piy* 変異は細胞自律的に振舞うことが明らかになった。このことは、網膜神経細胞が分化する際、*Piy* は細胞死を抑制することを示唆している。

最近の研究から、多くの細胞で癌抑制遺伝子 *p53* が細胞死を誘導することが報告されている。また、ゼブラフィッシュ網膜においても神経細胞分化の時期から *p53* の発現が上昇することが報告されている。

我々は *piy* 変異体においてモルフォリノアンチセンスを用いて *p53* の機能を阻害すると、細胞死がほぼ完璧にレスキューし正常な網膜が形成されることを見出した。この結果は、*piy* 変異体での細胞死は *p53* に依存していること、*piy* 変異体でも細胞死を回避できれば神経細胞分化が正常に起こることを示している。

これらの結果から、*Piy* は *p53* 依存性のアポトーシス経路を抑制する可能性が示唆された。現在、*piy* 変異体の責任遺伝子のクローニングを進めている(補足資料参照、未公開)。

(iv) ヒト網膜遺伝病のモデルとなる視細胞変性の突然変異体の解析

ヒトの網膜においては網膜色素変性症 (retinitis pigmentosa) に代表される視細胞が特異的に変性する遺伝病が知られている。これらの遺伝疾患は失明の原因の約 20%を占めるといふ疫学調査もあり、そのメカニズムの解明は医学的にも重要な問題である。

最近のヒトのゲノムプロジェクトが進み、160の視細胞変性を示す変異座うち100まで責任遺伝子が明らかになった。しかし、その多くのものは未だ機能が不明である。

我々は視覚行動を指標にした変異体スクリーニングから、視運動反応 (optokinetic response, OKR) を示さない3系統のゼブラフィッシュ突然変異体 *twilight (tli)*, *eclipse (els)*, *corona (coa)* を同定した。

これらの変異体では網膜電位は発生せず、視細胞が機能しない。このうち *tli* 変異体では、視細胞は一旦分化するが、多層の光受容膜から構成される外節が縮退し、受精後8日目には変性して消失する(図9)。

電子顕微鏡観察から、*tli* 変異体の外節では光受容膜の規則的な形成が異常になっている

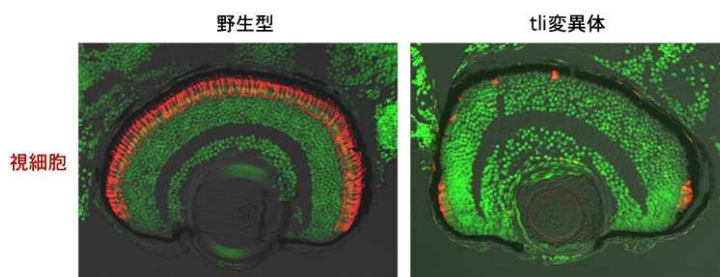


図9 *tli* 変異体の7日目の視細胞。*tli* 変異体では視細胞(赤色)が変性し失われる。

ことが明らかになった。このことから、*tli* 遺伝子は光受容膜の形成に必要な蛋白質をコードする可能性が高い。

視細胞外節の形成維持に関わる因子として、光受容膜の縁に局在する膜蛋白質 Peripherin/ROM1 が知られており、その欠損はヒトにおいて視細胞変性の原因となることが報告されている。私達はゼブラフィッシュにおけるこれらの相同遺伝子の遺伝子座を調べ、*tli* 変異とは一致しないことを確認した。

さらに、BACライブラリーのスクリーニングを行い、*tli*変異が存在するゲノム領域 340kb をカバーする BAC クローンをすべて単離した。ゼブラフィッシュのゲノムデータベースを用いて、これらの BAC クローンに対応する領域を調べると複数の遺伝子がアノテートされている。現在、これらの遺伝子に対して *tli* 変異体から調整した cDNA の塩基配列を決めることで、変異の有無を調べている。

視機能性眼振反応に異常を示す *eclipse* の責任遺伝子のクローニングも進めている(補足資料参照、未公開)。

研究の総括と今後期待される効果

本研究により、ゼブラフィッシュ網膜をモデルに、突然変異体を解析する手法で、神経幹細胞から神経細胞が生まれるステップ、層構造のような神経回路が形成されるステップ、さらに神経細胞が維持されるステップを制御する因子を同定してきた(図 10)。

網膜幹細胞が増殖から神経分化へ切り替わるステップでは HDAC1 によって Wnt 経路や Notch 経路を抑制することが重要であることを明らかにした。

我々の以前の研究により、ゼブラフィッシュの網膜神経細胞分化には Hh や FGF 経路が関わることを明らかにしている。今後、HDAC1 経路とこれらのシグナル経路との関係を明らかにすることによ

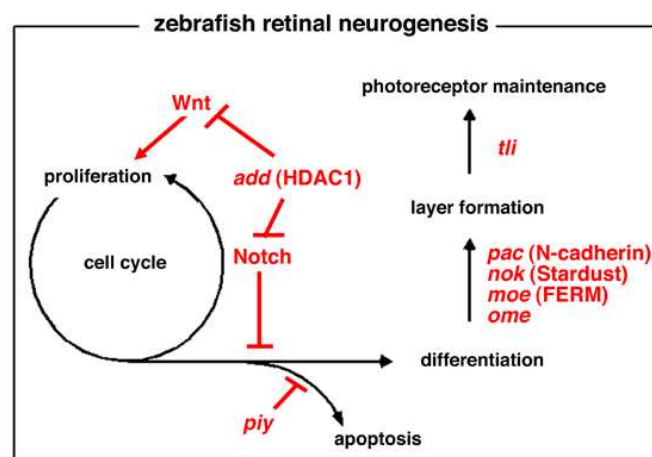


図 10 網膜における神経細胞分化とゼブラフィッシュ突然変異体の関係

て、増殖から分化へのスイッチメカニズムの全貌が解明されていくことが期待できる。

また、*pjy* 変異体の存在は分化過程において細胞死を抑制する仕組みが存在することを示唆しており、将来 *pjy* 遺伝子の機能解析によって、分化過程に細胞死を起動する仕組みが明らかになり、分化における細胞死制御の意義が明確になると期待される。

さらに、層構造に代表される神経回路の構築には、今回の研究で N-cadherin, Stardust, FERM 蛋白など3つの因子が必要であることが明らかになった。まだ責任遺伝子が同定されていない *Ome* を含めて、これらの因子は網膜において細胞極性の確立に働くことから、細胞極性や接着帯の維持が層構造を形成する上で重要であることが明らかになった。

また、N-cadherin に関しては活性が低い hypomorph のアリルを用いることで、初期の網膜細胞の極性維持だけでなく、アマクリン細胞の樹状突起形成や、視神経の軸索走行、水晶体の繊維化など網膜分化における多種類の機能が個体レベルで明らかになった。

神経細胞は一旦分化すると生涯を通じて維持される。ここでは視細胞に焦点をあて *tli* 変異体を同定した。この変異体では光受容膜の形成に異常を示し、最終的に視細胞が変性する。将来 *tli* 変異体の責任遺伝子の同定することで視細胞変性の仕組みの一端を解明でき、ヒトにおける網膜変性遺伝病の解明へ貢献していくと期待される。

3-9

サブテーマ名

内耳の形態形成に異常をきたす突然変異の解析

担当

船橋淳一グループ(東北大学)

(1)研究実施内容及び成果

脊椎動物の内耳は、その機能と密接に結びついた三次元的な構造を持つことから、形態形成のメカニズムを研究するモデルとして適している。内耳原基(耳胞)の背側からは三半規管が形成される。ゼブラフィッシュの半規管形成は、耳胞内部への上皮の突出に始まる。前方・側方・後方・腹側からの4ないし5の突出が中央で融合し、3つの柱状構造を作り、これらがやがて個々の半規管のドーナツ型の「芯」となる(図1)。この過程では組織を構成する細胞の増殖や移動、さらに細胞死などが密接にかかわり合っていると考えられる。

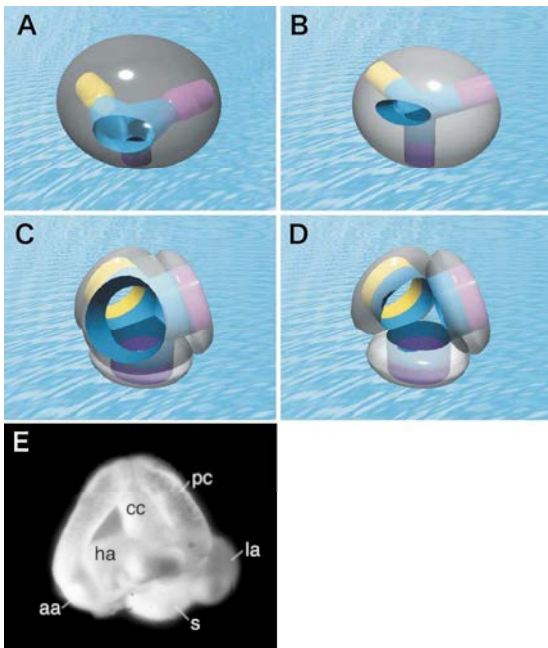


図1. A-D, ゼブラフィッシュ正常発生における三半規管形成過程の模式図。

耳胞(グレーの球)内部への上皮の突出(青, 側方: 黄, 前方: マゼンダ, 後方: 紫, 腹側)が融合し, トネル状の構造を形成する。この構造が後のそれぞれの半規管の中心の穴に相当する。E, 受精後20日の稚魚の左の内耳。aa, 前半規管膨大部; ha, 外側半規管膨大部; pc, 後半規管; cc, 総脚; s, 球形嚢; la 壺(蝸牛に相当)。

平成16年度からこのグループでは、大規模スクリーニングの結果得られた三半規管の形態形成過程に異常を生ずるミュータントを4系統(sand dust, gallery, cave, icicle)の解析を進めて来た。

その内の一つは、上皮の突出が全く起こらず、半規管が形成されない。他の3系統は耳胞内部への突出形成が異常で、それぞれ表現型が異なるが、いずれも結果として三半規管の形態に異常が生ずる。これらのミュータントの耳胞で発現するマーカー遺伝子に異常が無いか検討したところ、gallery 系統(図2A, C)で BMP2/4 の発現の異常を見いだした。

他の系統では現在までのところ、調べた限りのマーカーに関しては特に異常が見つかっていない。現在、原因遺伝子のクローニングを目指し、作業を行っている。なお、これらのミュータントはいずれも、これまでに報告されたものとは表現形が異なる。

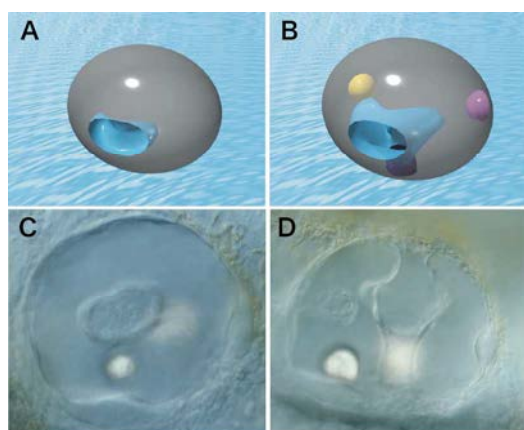


図2. ミュータントの表現形.

A, gallery の表現形の模式図. 側面からの上皮突出(青)のみが形成される.

B, icicle の表現形の模式図. 前方(黄)と後方(マゼンダ)からの突出が途中までしかのびない. C, 受精後61時間の gallery の内耳原基の側面図. D, 受精後97時間の icicle の内耳原基の側面図.

(2) 研究成果の今後期待される効果

これらのミュータントの原因遺伝子のクローニングとそれらの機能解析から、これまでに全く知られていなかった形態形成に関わる遺伝子や遺伝子カスケードの発見が期待される。また今後これらの成果に基づき内耳の形態形成機構の研究を進めることから、再生医療への道も開けるであろう。

ケージド mRNA による時空間特異的遺伝子発現制御技術の開発

担当

岡本仁グループ(理化学研究所、脳科学総合研究センター)

1:ケージド mRNA による時空間特異的遺伝子発現制御技術の開発

(安藤秀樹)

ゼブラフィッシュで単離された遺伝子の機能を詳細に解析するために、UCSD の Roger Tsien 教授の研究室で新規のケージド化合物 6-bromo-4-diazomethyl-7-hydroxycoumarin (Bhc-diazo) の合成に成功した古田寿昭博士(東邦大)と共同研究を行い、当該遺伝子から試験管内で合成した mRNA のリン酸基に、新規に合成された光感受性ケージング用試剤 6-bromo-4-diazomethyl-7-hydroxycoumarin (Bhc-diazo)をエステル結合させる技術を開発した。なお、本法は国際特許取得済みであり、新規ケージド試剤はライセンス供与先の和光純薬工業株式会社から販売中である。

ケージド mRNA は極めて弱い紫外線の瞬間照射によりアンケージされるので、これを受精卵に注入後培養した胚の任意の時期および任意の部位に紫外線スポット光を瞬間照射することで目的の時期に目的の場所にのみ遺伝子発現を誘導することができるようになった(mRNA アンケージング法)。本技術により、機能を調べたい遺伝子を時空間特異的に発現させることで標的領域の応答が観察できる上、従来の過剰発現実験のように本来その遺伝子が発現しない発生時期および場所に全身レベルで恒常的な発現を行うことによる発生異常や致死性の問題を解決した。

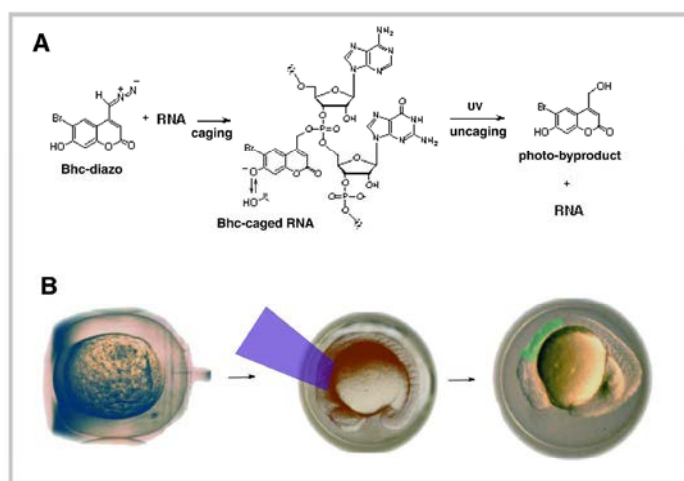


図1 BhcによるmRNAケージングを使った遺伝子発現調節の仕組み
(a) Bhc-diazoのmRNAへの結合と、紫外線照射による解離機構
(b) 1細胞期のゼブラフィッシュ胚へのケージド mRNAの注入(左)。胚の一部への紫外線照射(中央)。紫外線照射部での蛋白合成(右)。

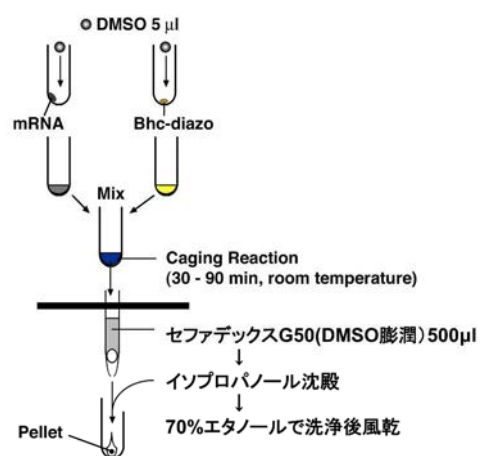


図2 Bhc-diazoによるmRNAケージングの流れ
全ての操作は、紫外線を遮蔽するシートで覆った蛍光灯のもとで行う。

ケージド mRNA 水溶液に対する高性能分光光度計による精密な吸光スペクトル分析の結果、最も効率的にアンケーシングできる条件ではRNA分子に結合したBhc基はプロトン化・イオン化いずれの状態でも存在し、平均 35 塩基に1分子の頻度で結合していることが明らかになった。さらに Bhc-caged mRNA では内在性 mRNAと比較し化学的安定性が著明に増加していることを確認した。また株式会社オリンパスとの共同開発によりアンケーシングに必要な直径 10-100 マイクロメートルの紫外線スポット照射システムを開発し、発生中の胚の任意の標的部位に照準を合わせた瞬間照射が可能となった。

2: ケージド mRNA と遺伝子機能阻害併用法による前脳形成遺伝子機構の解明

(安藤秀樹)

さらに、mRNA ケージング法による異所的遺伝子発現誘導と標的遺伝子発現阻害法の併用による形質救済効果を指標とした遺伝子機能間のエピスタシス解析により脊椎動物前脳容積制御に関わる中核的遺伝子発現制御機構 Six3-Lhx2 経路を発見した。

*Six/Sine oculis(So)*ファミリーに属す Six-ホメオドメイン型転写因子である Six3 と LIM-ホメオドメイン型転写因子である Lhx2 とともに原腸胚終了期に予定前脳域で酷似した発現パターンを示す。さらに両者とも前脳特異的 mRNA アンケーシングにより著明な前脳容積の拡大と終脳ニューロンクラスター内の神経細胞数の増加という共通の形質を示す。

これらの発現・機能プロファイルの類似性から両者の機能的エピスタシスの決定を試みた。

Lhx2は通常の 受精卵への mRNA 注入による全身レベルでの恒常的過剰発現では非特異的な発生阻害効果による背側化が誘導されるため、本来の発現領域である前脳での機能解析が不可能であった。そこで私が開発した mRNA ケージング技術を用いて前脳特異的なアンケーシングによる Lhx2 の過剰発現を行った結果、前脳の極性と領域化に全く影響を与えることなく当該領域の細胞分裂と神経分化の両面を著明に促進することがわかった。

そこで Lhx2 と機能的関連が強く示唆される Six3 を用いて以下の実験を行い、両者間の機能的関係を解析した。

- (1) ケージド *lhx2* mRNA と *six3* アンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド (MO)の共注入を受け発生中の胚の予定前脳域へのピンポイント紫外線照射による Six3 機能阻害下での Lhx2 前脳過剰発現効果
- (2) ケージド *six3* mRNA と *lhx2* MO の共注入を受け発生中の胚の予定前脳域へのピンポイント

紫外線照射による Lhx2 機能阻害下での Six3 前脳過剰発現効果

の両面を遺伝子発現・細胞分裂・神経分化の観点から詳細に解析した。その結果、(1)においては、Lhx2 単独の前脳過剰発現効果を再現した。一方(2)においてはいずれの観点についても Lhx2 機能阻害効果を再現した。

以上の結果から私は Lhx2 は Six3 の機能的下流に位置し Six3 が前脳形成に際しプレパターン化を構築後当該領域の細胞分裂および神経分化を促進する過程において、主要な介在因子として働くと結論した。

加えてノックアウトマウスの知見から Lhx2 が哺乳動物の大脳皮質形成に正の役割を担うことが示唆されているので、本研究で明らかになったゼブラフィッシュ Six3-Lhx2 経路の前脳容積と神経分化への正の役割が、哺乳動物が進化の過程で大脳皮質容積を増大させてきた際に用いられたカギとなる機構である可能性がある。

4 研究参加者

研究グループ名： 岡本グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
岡本仁	理研 BSI	グループ ディレクター	総括	H12.11-	
韓昌均	CREST	研究員	突然変異解析	H13.5-H16.7	
木下滋晴	CREST	研究員	突然変異解析	H14.4-H17.3	
田中英臣	CREST	研究員	突然変異解析	H12.11-	研究補助員 (H13.4-H15.3)
安藤秀樹	CREST	研究員	遺伝子発現系の開発	H12.11-	H17.4-CREST
岩崎美樹	CREST	技術員	突然変異解析	H13.4-H16.11	
小林恵実	CREST	技術員	突然変異解析	H16.4	
鈴木彰夫	CREST	研究補助員	実験動物の飼育・管理	H13.6-	
酒井智子	CREST	研究補助員	実験動物の飼育・管理	H14.2-	
植村修	CREST	研究補助員	突然変異解析	H16.4-H17.3	
和田浩則	理研 BSI	研究員	突然変異解析	H12.11-	
相澤秀紀	理研 BSI	研究員	突然変異解析	H14.4-	
鶴岡佐知子	理研 BSI	テクニカルスタッフ	突然変異解析	H13.6-	CREST 技術員(H13.6-H17.10)
佐藤美紀	理研 BSI	テクニカルスタッフ	突然変異解析	H13.6-	CREST 技術員(H13.6-H17.10)
白木利幸	理研 BSI	テクニカルスタッフ	突然変異解析	H16.7-	CREST 技術員(H16.7-H17.10)
中山里実	理研 BSI	テクニカルスタッフ	突然変異解析	H12.11-	
佐藤レイ子	理研 BSI	テクニカルスタッフ	突然変異系統維持	H12.11-	
島田敦子	理研 BSI	テクニカルスタッフ	事務	H12.11-	
野島康弘	CREST	研究員	突然変異単離・解析	H13.4-H16.4	技術員(H13.4-H15.3)
李海昌	CREST	研究員	突然変異単離・解析	H13.10-H15.12	
岡村睦美	CREST	技術員	突然変異単離・解析	H13.6-H16.3	
名和妙美	CREST	技術員	突然変異単離・解析	H13.5-H15.5	
山崎裕子	CREST	研究補助員	実験動物の飼育・管理	H14.2-H15.	
前田龍	理研 BSI	研究員	突然変異単離・解析	H13.9-H16.4	
浜岡崇憲	理研 BSI	JRA	突然変異単離・解析	H13.4-H16.3	研究補助員 (H13.4-H15.3)

佐藤淳	東京工科大	助教授	突然変異単離・解析	H13.4-H15.3	CREST 研究員 (H13.4-15.3)
鷹架美賀子	理研 BSI	テクニカルスタッフ	突然変異単離・解析	H13.2-H14.3	CREST 技術員(H13.2-H14.3)
花岡龍毅	京都大学	助手	突然変異単離・解析	H12.11-H15.3	CREST 研究補助員 (H12.11-H15.3)

研究グループ名： 政井グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
政井一郎	理研 (独立主幹)	エディター	突然変異解析	H14.4-	
西脇優子	理研 (独立主幹)	ユニット研究員	突然変異解析	H14.4-	
小森敦子	理研 (独立主幹)	テクニカルスタッフ	突然変異解析	H14.4-	
山口雅裕	理研 (独立主幹)	ユニット研究員	突然変異解析	H14.4-	
藤森典子	理研 (独立主幹)	テクニカルスタッフ	突然変異解析	H15.4-	
武内昌哉	理研 (独立主幹)	基礎特別研究員	突然変異解析	H15.4-	
久米直子	CREST	研究補助員	実験動物飼育・管理	H14.7-	
長谷川公子	CREST	研究補助員	実験動物飼育・管理	H14.7-H16.3	

研究グループ名： 豊田グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
豊田敦	理化学研究所	上級研究員	突然変異解析	H16.4—	

研究グループ名： 東海林グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
東海林互	東北大 加齢研	助手	突然変異解析	H14.4--	

研究グループ名： 舟橋グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
舟橋淳一	東北大 加齢研	助教授	突然変異解析	H16.4--	

研究グループ名： 二階堂グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
二階堂昌孝	埼玉大学	助手	突然変異解析	H16.4--	

研究グループ名： 川上グループ _____

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
川上厚志	東京大学	助手	突然変異解析	H16.4--	

研究グループ名： 佐藤 グループ _____

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
佐藤淳	東京工科大学	助教授	突然変異解析	H16.4—	
野島康弘	東京工科大学	研究員	突然変異解析	H16.4--	

5 成果発表等

(1)論文発表(国内 19 件、海外 31 件)

Ando H, Kobayashi M, Tsubokawa T, Uyemura K, Furuta T, and Okamoto H. Lhx2 mediates the activity of Six3 in zebrafish forebrain growth. **Dev Biol.** 287(2):456-68(2005)

Yamaguchi, M., Tonou-Fujimori, N., Komori, A., Maeda, R., Nojima, Y., Li, H., Okamoto, H. and Masai, I. Histone deacetylase 1 regulates retinal neurogenesis in zebrafish by suppressing Wnt and Notch signaling pathways. **Development**, 132, 3023 - 3043. (2005).

Masai, I., Yamaguchi, M., Tonou-Fujimori, N. and Okamoto, H. Hedgehog-PKA pathway regulates two distinct steps of the differentiation of retinal ganglion cells: the cell-cycle exit of retinoblasts and their neuronal maturation. **Development** 132, 1539 - 1553. (2005).

Wada, H., Iwasaki, M., Sato, T., Masai, I., Nishiwaki, Y., Tanaka, H., Sato, A., Nojima, Y. and Okamoto, H. Dual roles of zygotic and maternal Scribble1 in neural migration and convergent extension movements in zebrafish embryos. **Development** 132, 2273 - 2285. (2005).

Kawakami, A., Nojima, Y., Toyoda, A., Ishida-Takahoko, Satoh, M., Tanaka, H., Wada, H., Masai, I., Terasaki, H., Takeda, H. and Okamoto, H. The zebrafish *You/Scube2* attenuates the long-range influence of dorsal BMPs in the developing spinal cord. **Current Biol.** 15, 480 - 448. (2005).

Li, Q., Shirabe, K., Thisse, C., Thisses, B., Okamoto, H., Masai, I., and Kuwada J. Y. Chemokine signaling regulates retinal ganglion cell number and axon guidance in zebrafish. **J. Neurosci.** 25, 1711 –1717. (2005).

Aizawa, H., Bianco, I.H., Hamaoka, T., Miyashita, T., Uemura, O., Concha, M.L., Russell, C., Wilson, S.W., and Okamoto, H. Laterotopic Representation of Left-Right Information onto the Dorso-Ventral Axis of a Zebrafish Midbrain Target Nucleus, **Current Biology**, 15: 238-243, 11.91 (2005)

Emoto, Y., Wada, H., Okamoto, H., Kudo A., and Imai, Y. Retinoic acid-metabolizing enzyme Cyp26a1 is essential for determining territories of hindbrain and spinal cord in zebrafish, **Developmental Biology**. 278:415-427 (2005)

Uemura, O., Okada, Y., Ando, H., Guedj, M., Higashijima, S., Shimazaki, T., Chino, N., Okano, H., and Okamoto, H. Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor and sensory neuron-specific expression, **Developmental Biology** 278:567-606 (2005)

Okamoto H, Hirate Y, Ando H. Systematic identification of factors in zebrafish regulating the early midbrain and cerebellar development by ordered differential display and caged mRNA technology. **Front Biosci.** 9:93-9 (2004)

Miyashita T, Yeo SY, Hirate Y, Segawa H, Wada H, Little MH, Yamada T, Takahashi N, Okamoto H. PlexinA4 is necessary as a downstream target of Islet2 to mediate Slit signaling for promotion of sensory axon branching.

Development. 131(15):3705-15 (2004)

Yeo SY, Miyashita T, Fricke C, Little MH, Yamada T, Kuwada JY, Huh TL, Chien CB, Okamoto H. Involvement of Islet-2 in the Slit signaling for axonal branching and defasciculation of the sensory neurons in embryonic zebrafish. **Mechanisms of Development.** 121(4):315-24 (2004)

Hanaoka, R., Ohmori, Y., Uyemura, K., Hosoya, T., Hotta, Y., Shirao, T., and Okamoto H. Zebrafish *gcmb* is required for pharyngeal cartilage formation. **Mechanisms of Development.** 121: 1235–1247 (2004)

Ando H, Furuta T, Okamoto H. Photo-mediated gene activation by using caged mRNA in zebrafish embryos. **Methods in Cell Biology** 77:159-71 (2004)

Miyasaka, N., Sato, Y., Yeo, S-Y., Chien, C-B., Okamoto, H., and Yoshihara, Y. Robo2 mediates the formation of an initial axon scaffold essential for establishment of precise glomerular map in the zebrafish olfactory system. **Development,** 132:1283-1293 (2004)

Wolman, M. A., Liu, Y., Tawarayama, H., Shoji, W., and Halloran, M. C. Repulsion and Attraction of Axons by Sema3D are Mediated by Different Neuropilins in vivo, **J. Neuroscience,** 24 p8428-8435 (2004)

Liu, Y., Berndt, J., Su, F., Tawarayama, H., Shoji, W., Kuwada, J. Y. and Halloran, M. C., Semaphorin3D guides retinal axons along the dorsal-ventral axis of the tectum., **J. Neuroscience** 24 p310-318, 2004

Ober EA, Olofsson B, Makinen T, Jin SW, Shoji W, Koh GY, Alitalo K, Stainier DY., Vegfc is required for vascular development and endoderm morphogenesis in zebrafish., **EMBO Rep.** 1 p78-84, 2004

Ando H, Okamoto H. Practical procedures for ectopic induction of gene expression in zebrafish embryos using Bhc-diazo-caged mRNA. **Methods Cell Science,** 25(1-2):25-31, 2003

Hutson LD, Jurynece MJ, Yeo SY, Okamoto H, Chien CB. Two divergent slit1 genes in zebrafish. **Developmental Dynamics** 228(3):358-69, 2003

Hirate Y, Okamoto H, Yamasu K. Structure of the zebrafish fasciclin I-related extracellular matrix protein (betaig-h3) and its characteristic expression during embryogenesis. **Gene Expression Patterns.** 3(3):331-6, 2003

Xiao, T., Shoji, W., Zhou, W., Su, F., and Kuwada, J.Y. Transmembrane Sema4E guides branchiomotor axons to their targets in zebrafish, **J. Neuroscience** 23 p4190-4198, 2003

Shoji, W., Isogai, S., Sato-Maeda M., Obinata M., and Kuwada, J. Y., Semaphorin 3A1 regulates angioblast migration and vascular development in zebrafish embryos, **Development**, 130 p3227-3236, 2003

Masai, I., Lele, Z., Yamaguchi, M., Komori, A., Nakata, A. Nishiwaki, Y., Wada, H., Tanaka, H., Nojima, Y., Hammerschmidt, M., Wilson, S. W. and Okamoto, H. N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neuritis. **Development** 130: 2479-2494. 2003

Okamoto, H., Segawa, H., and Higashijima, S. Toward genetic dissection of motor neuron differentiation. Aquatic Genome-Steps toward a great future., Shimizu, N., Aoki, T., Takashima, F., eds., Springer-Verlag, Tokyo 2003

Bingham, S., Higashijima, S., Okamoto, H., and Chandrasekhar, C. The Zebrafish trilobite Gene Is Essential for Tangential Migration of Branchiomotor Neurons. **Developmental Biology**, 242: 149 – 160. 2002

Zeller J, Schneider V, Malayaman S, Higashijima S, Okamoto H, Gui J, Lin S, Granato M.: Migration of zebrafish spinal motor nerves into the periphery requires multiple myotome-derived cues. **Developmental Biology** 252:241-56, 2002

Segawa H., Miyashita T., Hirate Y., Higashijima S., Chino N., Uyemura K., Kikuchi Y. and Okamoto H. Functional repression of Islet-2 by disruption of the heteromeric complex with Ldb impairs peripheral axonal outgrowth by the primary sensory and motor neurons in embryonic zebrafish. **Neuron** 30: 423-436. 2001

Mizuno T., Kawasaki M., Nakahira M., Kagamiyama H., Kikuchi Y., Okamoto H., Mori K., and Yoshihara Y. Molecular diversity in zebrafish ncam family: three members with different vase usage and distinct localization. **Mol Cell Neurosci**. 18:119-30 2001

Hirate, Y., Mieda, M., Harada T, Yamasu K. and Okamoto, H. Identification of *ephrin-A3* and novel genes specific to the midbrain-MHB in embryonic zebrafish by ordered differential display. **Mechanisms of Development** 107: 83-96. 2001

Ando, H., Furuta, T., Tsien, R. Y. and Okamoto, H. Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos. **Nature Genetics**, 28: 317 – 325. 2001

和田 浩則,岩崎 美樹,岡本 仁,辻本 豪三ほか RDA 法を用いたゼブラフィッシュの遺伝子マッピング, 実験医学別冊:ゲノム研究実験ハンドブック-高効率な発現解析から,多様な生物を用いた機能解析と注目の疾患・創薬研究まで,ゲノム研究法を完全網羅,羊土社,227-233 (2004)

岡本仁,植村修 運動神経細胞の特異化と Islet-1 ファミリー,蛋白質 核酸 酵素, 49:241-246. (2004)

岡本仁,宮下俊雄,YeoS.,瀬川浩 ゼブラフィッシュを使って神経軸索分岐機構を探る： $(-)\times(-)=(+)?$ ，細胞工学, 23:1024-1028. (2004)

政井一郎 視神経の軸索ガイダンスのメカニズム-視神経はどのように網膜の出口を見つけ、視交叉を形成するのか？ 実験医学 23 143 - 148. (2004)

政井一郎 “nagie oko – 網膜層構造形成に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体” 生体の科学 55, 466 - 167. (2004)

岡本仁 遺伝子に書き込まれた神経系の設計図を読みとる、2003 動物の形作り その最前線と新展開 178-192. (2003)

政井一郎 “nagie oko” 生体の科学 54, 70. (2003)

和田浩則、岡本仁 後脳の顔面運動神経細胞の移動機構、実験医学増刊 21(17):2304-2310. (2003)

和田浩則、岩崎美樹、岡本仁 突然変異単離による神経発生機構の遺伝的解析、神経研究の進歩 47(6):814-822. (2003)

安藤秀樹、古田寿昭、岡本仁 新規ケージド化合物を用いた遺伝子の光によるスイッチオン/オフ技術、生化学 75 (9) 1251-1254 (2003)

岡本仁、平手良和、安藤秀樹中脳・小脳分化における相互的誘導作用の分子機構を探る、実験医学 20: 667-675. (2002)

岡本仁 ゼブラフィッシュの神経発生、p30-4、脳の発生・分化・可塑性、シリーズ・バイオサイエンスの世紀、御子柴、清水、日本生化学会編、共立出版 2002

岡本仁 ヒトゲノム解析のロゼッタストーン—ゼブラフィッシュとフグのゲノム解析—、生体の科学 53(6): 551-559 (2002)

岡本仁、平手良和、安藤秀樹中脳・小脳分化における相互的誘導作用の分子機構を探る。脳・神経研究のフロンティア（脳のパターン形成、神経ネットワーク、そして注目の神経再生から臨床応用まで）仲村春和、村上富士夫編、実験医学、20:667-675 (2002)

安藤秀樹、古田寿昭、岡本仁 光で遺伝子発現を操る方法の開発：Bhc による核酸のケージング，蛋白質核酸 酵素 (47)125-132,2002

岡本仁、東島眞一、西脇優子、田中英臣、政井一郎、和田浩則、植松一眞、岡良隆、伊藤博信 ゼブラフィッシュを使った後脳発生機構の研究：その進化論的、分子生物学的基盤、魚類のニューロサイエンス：

魚類神経科学研究の最前線, 恒星社厚生閣 pp.290-303,2002

岡本仁,御子柴克彦,清水孝雄経の発生・分化 4:ゼブラフィッシュの神経発生,脳の発生・分化・可塑性,共立出版, pp.30--41,2002

岡本仁、平手良和、三枝理博、東島眞一、西脇優子、田中英臣、政井一郎、和田浩則、ゼブラフィッシュが開く脳分化・特異化機構研究の新展開ー中脳、後脳の部域特異化機構解明のための包括的アプローチー、生体の科学 52:216-223 (2001)

安藤秀樹、古田寿昭、岡本仁光で遺伝子発現を操る方法の開発ーBhcによる核酸のケーシングー、蛋白質核酸酵素 47: 125-132 (2001)

(2)口頭発表

招待、口頭講演(国内 74 件、海外 19 件)

Hitoshi Okamoto Lhx2 mediates the activity of Six3 in zebrafish forebrain growth, International Imaging Symposium: From static spots to dynamic proteome visualization and beyond, Foundation of the Center for Systems Biology (ZBSA), Freiburg, Germany,2005,11

Hitoshi Okamoto Fish-eye's view of the bertebrate brain development and evolution. Special Lecture for Vanderbilt Kennedy Center and Vanderbilt University Zebrafish Program, Nashville, USA,2005,9

Yamaguchi, M., Tonou-Fujiomri, N., Okamoto, H. and Masai, I. Mechanisms underlying retinal neurogenesis in zebrafish, 1st Strategy conference of zebrafish and medaka, at Barhabor, USA, 2005. 9

Take-uchi, M., Yokota, H., Raible, F., Brand, M., Okamoto, H. and Masai, I. Vax transcription factors control cell movement of optic stalk and formation of optic cup, 4th European zebrafish genetic and developmental meeting, at Dresden, Germany, 2005.7

Okamoto H. Asymmetric subnuclearization causes lateralized neural circuit in the habeluno-interpeduclar projection of zebrafish brain Genetic Systems for Neuroscience Research, Brain Research Center, UST and National Science Council Institute of Neuroscience, NYMU",Taipei,Taiwan,2005,1

OkamotoH. Development of lateralized neural circuits in zebrafish, 5th IBRO Asia-Pacific Neuroscience School, Bangkok,Thailand, 2004, 12

Okamoto H. Zebrafish as a model system to study neural circuit development for motion and emotion, The Inaugural Pacific Rim Brain Conf.Hawaii,USA,2004,8

Yamaguchi, M., Tonou-Fujimori, N., Komori, A., Maeda, R., Li, H., Nojima, Y., Okamoto, H. and Masai, I. An essential role of HDAC1 for cell cycle exit of retinal progenitor cells in zebrafish, 6th International conference on zebrafish development & genetics, at Madison, USA, 2004.8

Wada H., Iwasaki M., Sato T., Masai I., Nishiwaki Y., Tanaka H., Sato A., Nojima Y., Okamoto H. The *landlocked/scribble1* and *off-road/celsr2* are essential for migration of the facial motor neurons in the developing zebrafish hindbrain, 6th International Conference on Zebrafish Development and Genetics 6th Int. Conf. on Zebrafish Development and Genetics, Madison, USA, 2004,7-8

Aizawa H., Bianco I., Hamaoka T., Miyashita T., Uemura O., Concha M. L., Wilson S. W., Okamoto H. Left-right asymmetric subnuclearization of habenula causes its lateralized projection to the ventral midbrain, 6th International Conference on Zebrafish Development and Genetics 6th Int. Conf. on Zebrafish Development and Genetics, Madison, USA, 2004,7-8

Yamaguchi M., Tonou-Fujimori N., Komori A., Maeda R., Li H., Nojima Y., Okamoto H. and Masai I. An essential role of HDAC1 for cell cycle exit of retinal progenitor cells in zebrafish, 6th Int. Conf. on Zebrafish Development and Genetics Madison, USA, 2004, July-Aug.

Okamoto H. Development of lateralized neural circuits in zebrafish, Symposium on Neural Plasticity, Development and Repair, The Hong Kong Society of Neuroscience, Hong Kong,China,2004,4

Aizawa Hidenori, Ando Hideki, Concha Miguel, L.,Barth K. A., Wilson Stephen W., Okamoto Hitoshi, Left-right asymmetry of the habenulo-interpeduncular projection in zebrafish brain, 3rd European Meeting on Zebrafish and Medaka Development and Genetics, Paris,,France,2003,6

Okamoto Hitoshi, Inductive signaling cascades for defining regional specificity in zebrafish brain, Meeting of Japanese and French Zebrafish and Medaka Laboratories, Ecole Normale Supérieure,Paris,,France,2003,6

Shoji, W., Isogai, S., Sato-Maeda, M., Obinata, M., Kuwada, J.Y.: Semaphorin3A1 regulates angioblast migration and vascular development in zebrafish embryos. 3rd European Conference on Zebrafish and Medaka Genetics and Development, Paris 2003,6

Okamoto Hitoshi, Genetic dissection of molecular cascades controlling midbrain and hindbrain development in zebrafish, 3rd Picower-RIKEN Neuroscience Symposium on New Frontiers in Brain Science: From Molecules to Mind, Cambridge,,USA,2003,3

Okamoto Hitoshi, Ando Hideki, Epistatic analysis of gene regulation in zebrafish brain development using caged mRNA technology, 23rd Ann. Meet. of Australian Neuroscience Society Satellite Meetings: Regulation of Expression in the Brain, Heron Island, Australia, 2003,1

Okamoto H. Genetic dissection of differentiation and axonal outgrowth of the cranial motor neurons in zebrafish, 5th Ann. Japanese-American Beckman Frontiers of Science Symp., JSPS and U. S. National Academy of Science, Irvine, USA, 2002.12

Masai, I., Nishiwaki, Y., Wada, H., Tanaka, H., Komori, A., Nakata, A., Maeda, R., Li, H., Nojima, Y. and Okamoto, H. Identification of mutations affecting zebrafish retinal lamination, 5th International conference on zebrafish development & genetics, at Madison, USA, 2002.7

和田 浩則, 中山 里実, 岩崎 美樹, 佐藤 智美, 政井 一郎, 西脇 優子, 田中 英臣, 佐藤 淳, 野島 康弘, 岡本 仁 Wnt/Noncanonical パスウェイが、ゼブラフィッシュ後脳における運動神経細胞の移動を制御する, 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005, 12

田中 英臣, 前田 龍, 韓 昌均, 野島 康弘, 和田 浩則, 白木 利幸, 小林 恵実, 中山 涼子, 政井 一郎, 岡本 仁 ゼブラフィッシュ新規突然変異体を用いた三叉運動神経の細胞移動および軸索伸張経路の解析, 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005, 12

平手 良和, 岡本 仁 ゼブラフィッシュ胚中脳後脳境界特異的に発現する Canopy1 の FGF シグナルへの関与, 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005, 12

山口雅裕、藤森典子、政井一郎 ゼブラフィッシュ網膜での増殖・分化における細胞接着の役割, 第 28 回分子生物学会、ワークショップ、福岡、2005.12

和田浩則、中山里実、岩崎美樹、佐藤智美、政井一郎、西脇優子、田中英臣、佐藤淳、野島康弘、岡本仁 Wnt/Noncanonical パスウェイが、ゼブラフィッシュ後脳における運動神経細胞の移動を制御する, 第 11 回小型魚類研究会 岡崎 2005.9

平手良和、岡本仁 ゼブラフィッシュ胚中脳小脳原基形成における FGF シグナルと Canopy1 の役割, 第 11 回小型魚類研究会 岡崎 2005.9

山口雅裕、藤森典子、小森敦子、前田龍、李海昌、野島康弘、岡本仁、政井一郎 ヒストン脱アセチル化酵素 1 はゼブラフィッシュにおいて網膜神経細胞分化を制御する, 第 77 回日本遺伝学会年会 代々木、2005.9

佐藤智美、浜岡崇憲、相澤秀紀、岡本仁 A Pattern of projection for the tract involving visuomotor transformation in zebrafish, 第 28 回日本神経科学大会 (Neuroscience 2005) 横浜 2005.7

木下滋晴、田中英臣、和田浩則、鶴岡佐知子、岡本仁 4-dimensional imaging of development of vagus motor nuclei in normal and mutant zebrafish 第 28 回日本神経科学大会 (Neuroscience 2005) 横浜 2005.7

相澤秀紀、後藤翠、岡本仁 Developmental study on generation of left-right asymmetry in zebrafish habenular nucleus 第 28 回日本神経科学大会 (Neuroscience 2005) 横浜 2005.7

田中英臣、前田龍、韓昌均、野島康弘、和田浩則、白木利幸、小林恵実、中山涼子、政井一郎、岡本仁 Genetic and imaging analysis of the migration and axonal pathfinding of the trigeminal motor neurons in zebrafish embryos, 第 28 回日本神経科学大会 (Neuroscience 2005) 横浜 2005.7

岡本仁 突然変異解析によるゼブラフィッシュ神経分化機構の解析, 日本発生生物学会第 38 回大会 仙台 2005.6

相澤秀紀、後藤翠、岡本仁 ゼブラフィッシュの脳の左右差, 日本発生生物学会第 38 回大会 仙台 2005.6

平手良和、岡本仁 中脳後脳境界特異的に発現する Canopy1 の FGF シグナルにおける細胞自律的な働き, 日本発生生物学会第 38 回大会 仙台 2005.6

田中英臣、前田龍、韓昌均、野島康弘、和田浩則、白木利幸、小林恵実、中山涼子、政井一郎、岡本仁 Time-lapse recording による三叉運動神経の細胞移動および軸索伸張経路の解析, 日本発生生物学会第 38 回大会 仙台 2005.6

小又尉広、野島康弘、中山里実、岡本仁、仲村春和、舟橋淳一 三半規管形成に影響を与えるゼブラフィッシュ突然変異体の解析, 日本発生生物学会第 38 回大会, 仙台, 2005.6

山口雅裕、藤森典子、小森敦子、前田龍、李海昌、野島康弘、岡本仁、政井一郎 ヒストン脱アセチル化酵素 1 はゼブラフィッシュにおいて網膜神経細胞分化を制御する, 第 38 回日本発生生物学会年会 仙台、2005.6

武内昌哉、岡本 仁、政井一郎 ゼブラフィッシュ眼球形成の遺伝学的解析 (眼柄収斂の細胞動態と突然変異体の解析), 第 38 回日本発生生物学会年会、仙台、2005.6

岡本仁 トランスジェニック技術を用いた神経細胞の可視化とその応用, 基礎生物学研究所研究会「小型魚類のさらなる発展を求めて」岡崎、2005.5

安藤秀樹 ゼブラフィッシュのコンディショナルな遺伝子発現誘導とノックダウン 基礎生物学研究所研究会「小型魚類のさらなる発展を求めて」岡崎、2005.5

岡本仁 脳の設計図を探る-遺伝子から神経回路まで-, 2005 ハイテクリサーチセンターシンポジウム: 脳科学研究の最前線 岩手医科大学ハイテクリサーチセンター委員会, 盛岡, 2005.2

山口雅裕、藤森典子、小森敦子、前田龍、李海昌、野島康弘、岡本仁、政井一郎 ゼブラフィッシュ変異体

ascending and descending における網膜細胞の過剰増殖は HDAC1 の欠損によって生じる, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2004, 12

政井一郎 ゼブラフィッシュ網膜における細胞増殖から分化へのスイッチ機構, 第 27 回分子生物学会ワークショップ, 神戸, 2004.12

川上厚志、野島康弘、田中英臣、豊田敦、石田（鷹架）美賀子、佐藤美紀、和田浩則、政井一郎、寺崎晴美、武田弘幸、岡本仁 背側神経に発現する細胞表面タンパク Scube2 による長距離のヘッジホッグシグナル制御機構, 第 27 回日本分子生物学会大会, 神戸 2004.12

田中 英臣、前田 龍、韓 昌均、野島 康弘、和田 浩則、白木 利幸、小林 恵実、中山 涼子、政井 一郎、岡本 仁 Characterization of the mutation affecting the development of trigeminal motor neuron 第 10 回小型魚類研究会、神戸、2004.11

Okamoto H. Zebrafish as a model system to study neural circuit development for motion and emotion, 11th CDB Meet.: Asia-Oceania Fish Meet. RIKEN CDB, RIKEN BSI, Kobe, 2004, 11,

Okamoto H. Canopy1, a novel enhancer of FGF8 signaling in the midbrain-hindbrain boundary development, Symposium on vertebrate brain pattern formation: 32nd IDAC symposium and symposium of brain pattern formation(MEXT), Sendai, 2004,10

西脇優子、小森敦子、相良 洋、鈴木えみ子、岡本 仁、政井一郎 視細胞外節における円盤膜形成に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体 twillight、第 27 回日本神経科学大会第 47 回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2004) 大阪、2004.9

山口雅裕、藤森典子、小森敦子、前田龍、李海昌、野島康弘、岡本仁、政井一郎 網膜幹細胞が過剰増殖するゼブラフィッシュ突然変異体 ascending and descending の解析, 第 37 回日本発生生物学会年会 名古屋、2004.9

相澤 秀紀、Isaac B.、浜岡 崇憲、宮下 俊雄、植村 修、Miguel C.、Wilson S.、岡本 仁 ゼブラフィッシュの脳の左右差
第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2004)大阪、2004、9

岡本 仁 LIM-homeodomain proteins in neural patterning 2004 Kobe Meeting on Vertebrate Brain Development,神戸,2004,7

Okamoto H. Asymmetric subnuclear organization causes lateralized neural circuit in the habenulo-interpeduncular projection in zebrafish brain, 2004 Kobe Meeting on Vertebrate Brain Development, Kobe, 2004,7

政井一郎 ゼブラフィッシュ突然変異から網膜神経細胞分化のメカニズムを探る, 第 37 回発生生物学

会大会 ワークショップ、名古屋、2004.6

山口雅裕, 藤森典子, 小森敦子, 前田龍, 李海昌, 野島康弘, 岡本仁, 政井一郎 網膜幹細胞が過剰増殖するゼブラフィッシュ突然変異体 ascending and descending の解析, 日本発生生物学会第 37 回大会, 名古屋, 2004, 6

和田 浩則, 岩崎 美樹, 佐藤 智美, 政井 一郎, 西脇 優子, 田中 英臣, 佐藤 淳, 野島 康弘, 岡本 仁 ゼブラフィッシュ後脳において顔面神経細胞の移動を制御する *Ilk/scr1* および *ord/celsr2* の機能解析, 日本発生生物学会第 37 回大会, 名古屋, 2004, 6

安藤 秀樹, 小林 麻己人, 岡本 仁 Lhx2 はゼブラフィッシュ前脳形成において Six3 の下流で機能する, 日本発生生物学会第 37 回大会, 名古屋, 2004, 6

相澤 秀紀, Bianco I., 浜岡 崇憲, 宮下 俊雄, 植村 修, Concha M. L., Wilson S. W., 岡本 仁 ゼブラフィッシュの脳の左右差, 日本発生生物学会第 37 回大会, 名古屋, 2004, 6

岡本仁 ゼブラフィッシュを用いた遺伝学は, 脳の発生と機能の解明にどこまで迫れるか?, 東京医科大学 21 世紀 COE プログラム「脳の機能統合とその失調」東京, 2004, 5

岡本 仁, Zebrafish as a normal model system to study neural circuit development for motion and emotion, 第 10 回光科学技術で拓く脳・精神科学平和探求研究会, 浜松, 日本 2004, 2

山口雅裕, 藤森典子, 小森敦子, 前田龍, 李海昌, 野島康弘, 岡本仁, 政井一郎 “ 網膜幹細胞が過剰増殖するゼブラフィッシュ突然変異体 ascending and descending の解析 ” 第 26 回分子生物学会 神戸, 2003.12

西脇優子, 小森敦子, 相良 洋, 鈴木えみ子, 野島康弘, 和田浩則, 田中英臣, 岡本 仁, 政井一郎 視細胞外節形成に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体 twilight の解析, 第 26 回分子生物学会 神戸, 2003.12

武内昌哉, Jonathan DW Clarke, Steve W Wilson, 岡本 仁, 政井一郎 Hedgehog, Nodal, FGF シグナルによる Vax 転写因子の制御とその眼柄領域特異化のメカニズム, 第 26 回分子生物学会 神戸, 2003.12

岡本 仁, 政井 一郎, 吉原 良浩, 日比 正彦, 川上 浩一, ゼブラフィッシュ・ナショナルバイオリソース計画, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003, 12

岡本 仁, 機能的神経回路網の形成を支配する遺伝子を求めて: モデル実験動物ゼブラフィッシュの果たす役割, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003, 12

Okamoto Hitoshi, Genetic dissection of molecular cascades controlling midbrain and hindbrain development in zebrafish, 6th Conference of the Asia-Pacific International Molecular Biology Network (A-IMBN) on Dramatic Movement of Life Science: Now to Future, Tokyo, Japan, 2003, 11

Okamoto Hitoshi, Comparative genomics approach for study of motor neuron differentiation, 2nd International Symposium on Aquatic Genomics, Tokyo, Japan, 2003, 9

平手 良和, 岡本 仁, 新規 FGF シグナル活性化因子 Canopy の中脳後脳境界における役割, 第 9 回小型魚類研究会, 和光, 2003, 9

相澤 秀紀, 宮下 俊雄, 安藤 秀樹, 岡本 仁, ゼブラフィッシュの脳の左右差, 第 9 回小型魚類研究会, 和光, 2003, 9

植村 修, 岡田 洋平, 安藤 秀樹, 東島 眞一, 島崎 琢哉, 千野 直一, 岡野 栄之, 岡本 仁, 進化的に保存されている Islet-1 遺伝子の脊髄運動神経細胞における転写制御, 第 9 回小型魚類研究会, 和光, 2003, 9

Okamoto Hitoshi, Inductive signaling cascades for defining regional specificity and left-right asymmetry in zebrafish brain, International Symposium on Dynamics of Neural Development, Osaka University, Toyonaka, Japan, 2003, 8

東海林 互 ゼブラフィッシュ脊髄運動神経の軸索ガイド機構, 第 26 回日本神経科学大会, 名古屋, 2003. 8

岡本 仁, ゼブラフィッシュを使って分る後脳分化の新しい分子機構, 第 26 回日本神経科学大会, 名古屋, 日本, Japan, 2003, 7

岡本 仁, 突然変異単離による神経発生機構の遺伝解析, 第 38 回脳のシンポジウム, 日本学術会議 脳・神経学研究連絡委員会, 東京, 2003, 3

山口雅裕, 小森敦子, 仲田明日香, 西脇優子, 野島康弘, 和田浩則, 田中英臣, 前田龍, 李海昌, Zsolt Lele, Steve Wilson, 岡本仁, 政井一郎 ゼブラフィッシュ網膜層構造形成に異常を示す突然変異体の解析, 第 25 回日本分子生物学会年会 横浜, 2002. 12

岡本仁 脳入出力神経細胞の分化と軸索伸展の遺伝解析, 第 45 回日本神経化学学会大会, 札幌, 2002. 7

政井一郎, 西脇優子, 和田浩則, 田中英臣, 小森敦子, 仲田明日香, 伊予部誠, 前田龍, 李海昌, 野島康弘, 岡本仁 ゼブラフィッシュ網膜における神経回路形成に異常を示す突然変異の解析 第 35 回日本発生生物学会年会 横浜 2002. 5

和田浩則, 政井一郎, 西脇優子, 田中英臣, 小森敦子, 吉澤あすか, 佐藤淳, 野島康弘, 岩崎美樹, 岡本仁 顔

面神経の運動神経細胞が移動しないゼブラフィッシュ突然変異体をもちいた神経細胞の移動機構の解析, 第 35 回日本発生生物学会大会, 横浜, 2002.5

岡本仁 ゼブラフィッシュを使った神経分化機構の遺伝学的研究、第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001.11

西脇優子、政井一郎、和田浩則、田中英臣、下田修義、小森敦子、中尾和加子、中山里実、内山学、佐藤淳、野島康弘、浜岡崇憲、岩崎美樹、稲吉妙美、鶴岡佐知子、佐藤美紀、岡本仁 視運動性眼振運動を利用した視細胞に以上のあるゼブラフィッシュ突然変異体の検出、第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001.11

政井一郎、西脇優子、和田浩則、田中英臣、下田修義、小森敦子、仲田明日香、伊与部誠、中尾和加子、中山里実、内山学、佐藤淳、野島康弘、浜岡崇憲、岩崎美樹、稲吉妙美、鶴岡佐知子、佐藤美紀、岡本仁 チューブリン抗体染色法によるゼブラフィッシュ網膜分化に関わる突然変異の単離、第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001.11

田中英臣、和田浩則、政井一郎、西脇優子、下田修義、小森敦子、中尾和加子、中山里実、内山学、佐藤淳、野島康弘、浜岡崇憲、岩崎美樹、稲吉妙美、鶴岡佐知子、佐藤美紀、岡本仁 チューブリン染色法による脊髄神経回路形成に関わる突然変異体の単離・解析、第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001.11

田中英臣、和田浩則、政井一郎、西脇優子、下田修義、小森敦子、中尾和加子、中山里実、内山学、佐藤淳、野島康弘、浜岡崇憲、岩崎美樹、稲吉妙美、鶴岡佐知子、佐藤美紀、岡本仁 ゼブラフィッシュの三叉・顔面運動神経の軸索伸展様式の解析と突然変異単離、第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001.11

和田浩則、政井一郎、西脇優子、田中英臣、下田修義、小森敦子、吉澤あすか、中尾和加子、中山里実、内山学、佐藤淳、野島康弘、浜岡崇憲、岩崎美樹、稲吉妙美、鶴岡佐知子、佐藤美紀、岡本仁 GFP 発現トランスジェニック・ゼブラフィッシュを用いた後脳運動神経細胞の軸索伸展および細胞移動に関する突然変異体の単離、第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001.11

岡本仁 ポストゲノム時代の神経分化機構研究、研究領域「脳を知る」のシンポジウム 東京, 2001

植村修、東島眞一、千野直一、岡本仁 *Islet-1* 遺伝子の感覚神経特異的なエンハンサー解析、第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会, 京都, 2001

宮下俊雄、呂相火華、平手良和、岡本仁 軸索伸展時における PlexinA2 と Slit の機能的相互作用の検証、第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会, 京都, 2001

和田浩則、東島眞一、岡本仁 三叉神経の軸索形成過程において、プラコード由来の神経細胞がパイオ

ニア・ニューロンとして働く、第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会,京都,2001

Hideki Ando, Toshiaki Furuta, Hitoshi Okamoto Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto (2001)

Ryuki Hanaoka, Toshihiko Hosoya, Yoshiki Hotta, Hitoshi Okamoto Transgenic overexpression of endothelin-1 and affects the pharyngeal cartilage formation. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto (2001)

Osamu Uemura, Shin-ichi Higashijima, Naoichi Chino, Hitoshi Okamoto Analysis of zebrafish Islet-1 enhancer and promoter using GFP. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto (2001)

Hironori Wada, Shin-ichi Higashijima, Hitoshi Okamoto The guidance of the motor axons by the sensory neurons in the trigeminal nerve in zebrafish. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto (2001)

Hideomi Tanaka, Shin-ichi Higashijima, Hitoshi Okamoto Axon pathfinding behavior of trigeminal and facial motor neurons in zebrafish. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto (2001)

Sang-Yeob Yeo, Hiroshi Segawa, Toshio Miyashita, Melissa H. Little, Toshiya Yamada, John Y. Kuwada, Hitoshi Okamoto Slit affects axonal pathfinding by neurons in zebrafish. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto (2001)

Toshio Miyashita, Sang-Yeob Yeo, Yoshikazu Hirate, Hitoshi Okamoto Functional interaction of PlkexinA2 and Slit2 in axon guidance of the primary sensory neurons in zebrafish embryos. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto (2001)

ポスター発表(国内 96 件、海外 18 件)

Sato Tomomi, Hamaoka Takanori, Aizawa Hidenori, Okamoto Hitoshi Genetical single-neuron labeling reveals projection patterns for the tract involving visuomotor transformation in zebrafish, 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2005), Washington DC, USA, 2005, 11

Shigeharu Kinoshita, Hideomi Tanaka, Hironori Wada, Sachiko Tsuruoka and Hitoshi Okamoto Time lapse imaging of development of vagus motor nuclei in normal and mutant zebrafish, 4th European Zebrafish Genetics and Development Meeting Dresden, Germany 2005.7

Hideomi Tanaka, Ryu Maeda, Chang-Gyun Han, Yasuhiro Nojima, Hironori Wada, Toshuyuki Shiraki, Megumi Kobayashi, Ryoko Nakayama, Ichiro Masai and Hitoshi Okamoto Time lapse imaging analysis of the migration and axonal pathfinding of the trigeminal motor neurons in normal and mutant zebrafish embryos, 4th European

Zebrafish Genetics and Development Meeting Dresden, Germany 2005.7

Tomomi Sato, Takanori Hamaoka, Hidenori Aizawa and Hitoshi Okamoto A pattern of tectobulbar projection involving visuomotor transformation in zebrafish, 4th European Zebrafish Genetics and Development Meeting Dresden, Germany 2005.7

Yuko Nishiwaki, Atsuko Komori, Hiroshi Sagara, Emiko Suzuki, Yasuhiro Nojima, Hironori Wada, Hideomi Tanaka, Hitoshi Okamoto and Ichiro Masai Cloning of zebrafish *eclipse* gene, which mutation causes photoreceptor degeneration, 4th European Zebrafish Genetics and Development Meeting Dresden, Germany 2005.7

Masaya Takeuchi, H. Yokota, R. Florian, B. Michael, Hitoshi Okamoto and Ichiro Masai Vax transcription factor control cell movement of optic stalk and formation of optic cup. 4th European Zebrafish Genetics and Development Meeting Dresden, Germany 2005.7

Hirate Y., Okamoto H. Midbrain-hindbrain boundary specific gene *canopy1* encodes a novel co-factor of FGF signaling, 6th International Conference on Zebrafish Development and Genetics, 6th Int. Conf. on Zebrafish Development and Genetics, Madison, USA, 2004, 7-8

Li Q., Shirabe K., Thisse C., Thisse B., Okamoto H., Masai I., Knaut H., Kuwada J. Y. Chemokine signaling regulates retinal ganglion cell number and axon guidance in zebrafish ,6th International Conference on Zebrafish Development and Genetics, 6th Int. Conf. on Zebrafish Development and Genetics, Madison, USA, 2004, 7-8

Sassa T., Okamoto H. Visualization of dorsolateral commissural neurons in the hindbrain: reciprocal inhibition and projection to the midbrain, 6th International Conference on Zebrafish Development and Genetics , 6th Int. Conf. on Zebrafish Development and Genetics, Madison, USA, 2004, 7-8

Kinoshita S., Wada H., Tanaka H., Okamoto H. Genetic dissection of the mechanisms for establishment of the vagus motor nuclei, 6th International Conference on Zebrafish Development and Genetics , 6th Int. Conf. on Zebrafish Development and Genetics, Madison, USA, 2004, 7-8

Uemura O., Okada Y., Ando H., Guedj M., Higashijima S., Shimazaki T., Chino N., Okano H., Okamoto H. Comparative functional genomics revealed three conserved enhancers of the *isl1* gene for motor and sensory neurons, 6th International Conference on Zebrafish Development and Genetics, 6th Int. Conf. on Zebrafish Development and Genetics, Madison, USA, 2004, 7-8

Tanaka H., Han C. G., Maeda R., Wada H., Masai I., Nishiwaki Y., Nojima Y., Okamoto H. Characterization of the mutation affecting the development of the trigeminal motor neurons, 6th International Conference on Zebrafish Development and Genetics , 6th Int. Conf. on Zebrafish Development and Genetics, Madison, USA, 2004, 7-8

Takeuchi M., Okamoto H. and Masai I. Cellular and genetical analysis of optic stalk constriction and eye morphogenesis, 6th Int. Conf. on Zebrafish Development and Genetics Madison, USA, 2004, 7-8.

Poggi L., Masai I. and Harris W. A. Intrinsic and extrinsic determinants for retinal ganglion cells: A time-lapse analysis, 6th Int. Conf. on Zebrafish Development and Genetics Madison, USA, 2004, 7-8

Yamaguchi, M., Komori, A., Nishiwaki, Y., Wada, H., Tanaka, H., Maeda, R., Li, H., Okamoto, H., and Masai, I. A zebrafish mutant, pinball eye, show defects in differentiation of CMZ cells in the eye, 3rd European zebrafish genetic and developmental meeting, Paris, France, 2003.7

Nishiwaki, Y., Komori, A. Sagara, H., Suzuki, E., Nojima, Y., Wada, H., Tanaka, H., Okamoto, H., and Masai, I. Analysis of three photoreceptor-loss mutants, twilight, eclipse-a and -b , 3rd European zebrafish genetic and developmental meeting, Paris, France, 2003.7

Nishiwaki, Y., Masai, I., Wada H., Tanaka, H., Komori, A., Nojima, Y. and Okamoto, H. Characterization of zebrafish mutants affecting development an maintenance of photoreceptor cells, 5th International conference on zebrafish development & genetics, Madison, USA, 2002.7

Hutson L., Yeo S., Okamoto H., Chien C. astray/robo2 controls retinal growth cone shape, guidance, and error correction. 2nd European Conf. on Zebrafish Genetics and Development, London, 2001

木下 滋晴, 田中 英臣, 和田 浩則, 鶴岡 佐知子, 岡本 仁ゼブラフィッシュの迷走神経核形成を制御する遺伝子群の同定, 第 28 回日本分子生物学会年会 福岡 2005, 12,

武内昌哉, 岡本 仁, 政井一郎 眼球形成不全 (コロポーマ) に関わる Vax 転写因子は細胞移動と細胞形態を支配する 第 28 回日本分子生物学会年会 福岡, 2005. 12

佐藤智美, 浜岡崇憲, 相澤秀紀, 岡本仁 ゼブラフィッシュ視覚運動変換に関わる視蓋延髄路の投射パターンと形成機構 第 11 回小型魚類研究会 岡崎 2005.9

田中英臣, 前田龍, 韓昌均, 野島康弘, 和田浩則, 白木利幸, 小林恵実, 中山涼子, 政井一郎, 岡本仁 Time-lapse recording による三叉運動神経の細胞移動および軸索伸張経路の解析 第 11 回小型魚類研究会 岡崎 2005.9

佐々貴之, 岡本仁 ゼブラフィッシュ後脳内耳側線核神経細胞の可視化および発生機構 第 11 回小型魚類研究会 岡崎 2005.9

木下滋晴, 田中英臣, 和田浩則, 鶴岡佐知子, 岡本仁 ゼブラフィッシュの迷走神経核形成における前駆細胞の移動と集合を制御する遺伝子群の同定第 11 回小型魚類研究会 岡崎 2005.9

青木誠、瀬川浩、内藤真由美、岡本仁 Islet-2 下流因子の探索, 11 回小型魚類研究会 岡崎 2005.9

相澤秀紀、後藤翠、岡本仁 Developmental study on the generation of left-right asymmetry in zebrafish habenular nucleus, 第 11 回小型魚類研究会 岡崎 2005.9

網代将彦, 前田(佐藤)美香, 新井健一, 帯刀益夫, 東海林互, ゼブラフィッシュにおける CRMP-2 の機能解析 第 11 回小型魚類研究会, 岡崎, 2005.9

佐藤智美、浜岡崇憲、相澤秀紀、岡本仁 ゼブラフィッシュ視覚運動変換に関わる視蓋延髄路の発生と投射パターン, 日本発生生物学会第 38 回大会 仙台 2005.6

木下滋晴、田中英臣、和田浩則、鶴岡佐知子、岡本仁 4 次元イメージングによるゼブラフィッシュ迷走神経核形成の突然変異解析, 日本発生生物学会第 38 回大会 仙台 2005.6

武内昌哉、岡本仁、政井一郎 ゼブラフィッシュ眼球形成の遺伝学的解析(眼柄収斂の細胞動態と突然変異体の解析), 日本発生生物学会第 38 回大会 仙台 2005.6

西脇優子、小森敦子、相良洋、鈴木えみ子、岡本仁、政井一郎 ゼブラフィッシュ視細胞変性突然変異体 *eclipse* の責任遺伝子の同定, 日本発生生物学会第 38 回大会 仙台 2005.6

山口雅裕、藤森典子、小森敦子、前田龍、李海昌、野島康弘、岡本仁、政井一郎 ヒストン脱アセチル化酵素 1 はゼブラフィッシュ網膜において神経分化のタイミングを制御する、日本発生生物学会第 38 回大会 仙台 2005.6

前田(佐藤)美香、帯刀益夫、東海林互, ゼブラフィッシュ脊髄一次運動神経の double-exit phenotype について 第 38 回日本発生生物学会大会, 仙台, 2005.6

前田(佐藤)美香、帯刀益夫、東海林互, ゼブラフィッシュ脊髄一次運動神経 CaP の位置決めに対する Sema3A2 の関与 第 76 回日本動物学会大会, つくば 2005

山口雅裕、藤森典子、岡本仁、政井一郎 網膜幹細胞の分化に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体 *pinball eye* の解析, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2004, 12 月

平手 良和、岡本 仁 Canopy1 は細胞自律的に FGF シグナルに関与する, 第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004.12

江本 裕美、和田 浩則、岡本 仁、工藤 明、今井 義幸 レチノイン酸分解酵素 Cyp26a1 はゼブラフィッシュにおいて後脳と脊髄の境界を決定するのに重要である, 第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004.12

田中 英臣、前田 龍、韓 昌均、野島 康弘、和田 浩則、白木 利幸、小林 恵実、中山 涼子、政井 一郎、岡本 仁 ゼブラフィッシュ三叉運動神経の発生に異常を示す突然変異体を用いた細胞分化および軸索伸展機構の解析, 第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004.12

木下 滋晴、田中 英臣、和田 浩則、岡本 仁 遺伝学的手法を用いて解析する迷走神経の発生機序 第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004.12

原田 英育、佐藤 達也、平手 良和、岡本 仁、仲村 春和 ニワトリ胚中脳の領域形成と Canopy 遺伝子, 第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004.12

政井一郎 ゼブラフィッシュ網膜における細胞増殖から分化へのスイッチ機構, 第 27 回日本分子生物学会年会,神戸,2004.12

澤田鮎子,政井一郎,橋本寿史,鈴木徹,有瀧真人,岡本仁,井出宏之,田村宏治 異類体の左右非対称な視交叉形成に関する分子機構の解析, 第 27 回日本分子生物学会年会,神戸,2004.12

西脇優子,小森敦子,相良洋,鈴木えみ子,岡本仁,政井一郎 細胞の分化に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体 corona の解析, 第 27 回日本分子生物学会年会",神戸,2004.12

武内昌哉,岡本仁,政井一郎 ゼブラフィッシュ眼柄収斂の細胞動態と眼球形成の遺伝学的解析第 27 回日本分子生物学会年会,神戸,2004,12

山際 貴雄、野島 康弘、田中 英臣、佐藤 美紀、岡本 仁 Analysis of *lullaby* and *weverer*, the novel mutants defective in the development of spinal motor neuron in zebrafish, 第 10 回小型魚類研究会、神戸、2004.11

木下 滋晴、和田 浩則、田中 英臣、岡本 仁 Genetic dissection of the mechanisms for establishment of the vagus motor nuclei, 第 10 回小型魚類研究会、神戸、2004.11

山口雅裕,藤森典子,岡本仁,政井一郎 An essential role of HDAC1 for cell-cycle exit of retinal progenitor cells in zebrafish 第 10 回小型魚類研究会,神戸,2004,11

安藤 秀樹 Lhx2 mediates Six3.2 for the zebrafish forebrain growth、第 10 回小型魚類研究会、神戸、2004.11

澤田鮎子,政井一郎,橋本寿史,鈴木徹,有瀧真人,岡本仁,井出宏之,田村宏治 Mechanisms of left-right asymmetrical crossing of optic nerve bundle in flounders 第 10 回小型魚類研究会,神戸,2004,11

西脇優子,小森敦子,相良洋,鈴木えみ子,岡本仁,政井一郎 視細胞外節における円盤膜形成に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体 twilight, 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2004),大阪,2004.9

俵山 寛司、帯刀 益夫、東海林 互、ゼブラフィッシュ・ニューロピリン-1・ホモログの発現調節機構の解明、第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会、2004.9

佐藤 智美、浜岡 崇憲、相澤 秀紀、岡本 仁、ゼブラフィッシュ視覚運動変換に関わる視蓋延髄路の発生と構造、第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004)、大阪、2004.9

佐々 貴之、岡本 仁、ゼブラフィッシュ後脳背外側交連神経細胞の可視化による結合様式の解析、第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004)、大阪、2004.9

前田 (佐藤) 美香、俵山寛司、John Y. Kuwada、帯刀益夫、東海林互、脊髄一次運動神経の medial 側への伸展に対する Sema3A1 の関与、第37回日本発生生物学会大会、2004.6

原田 英斉、佐藤 達也、平手 良和、岡本 仁、仲村 春和、ニワトリ胚中脳の領域形成と Canopy 遺伝子、日本発生生物学会第37回大会、名古屋、2004.6

木下 滋晴、田中 英臣、和田 浩則、岡本 仁、迷走神経核の形成に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体 *alluvion* の解析、日本発生生物学会第37回大会、名古屋、2004.6

小又 尉広、野島 康弘、岡本 仁、仲村 春和、舟橋 淳一、ゼブラフィッシュ内耳に関する変異体のスクリーニング、日本発生生物学会第37回大会、名古屋、2004.6

前田 (佐藤) 美香、俵山寛司、John Y. Kuwada、帯刀益夫、東海林互、脊髄一次運動神経の medial 側への伸展に対する Sema3A1 の関与、第37回日本発生生物学会大会、名古屋、2004.6

俵山 寛司、帯刀 益夫、東海林 互、ゼブラフィッシュ・ニューロピリン-1・ホモログの発現調節機構の解明、第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会、大阪、2004.6

Yamaguchi, M., Tonou-Fujimori, N., Komori, A., Maeda, R., Li, H., Nojima, Y., Okamoto, H. and Masai, I. Analysis of a zebrafish mutant, ascending and descending, showing overproliferation of retinal stem cells, Medaka genome and vertebrate evolution at Tokyo 2004.3

Sato-Maeda, M and Shoji, W., Sema3A1 regulation of spinal primary motor axon. The 10th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, Kobe, 2004

佐藤 淳、佐藤 美紀、和田 浩則、坪崎 陽一郎、田中 英臣、西脇 優子、政井 一郎、野島 康弘、岩崎 美樹、川上 厚志、岡本 仁、上鰻神経節の形成に異常を示す変異体 *nep* の原因遺伝子マッピングと、運動神経軸索の形成に異常を示す変異体 *epr* の原因遺伝子クローニング、第26回日本分子生物学会年、神戸、日本、2003,12

植村 修, 岡田 洋平, 安藤 秀樹, Guedj Mikael, 東島 眞一, 島崎 琢哉, 千野 直一, 岡野 栄之, 岡本 仁, 比較ゲノム情報学を用いた Islet-1 遺伝子の神経細胞サブタイプ特異的発現機構の解明, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 日本, 2003,12

佐藤 智美, 岡本 仁, 三品 昌美, Cloning and characterization of a zebrafish locomotion-behavioral mutant, vibrato, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003,12

俵山寛司, 佐藤-前田美香, 帯刀益夫, 東海林互, 軸索ガイダンスレセプター、ニューロピリン-1(nrp-1)の発現を制御するシスエレメントの解析, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003,12

和田 浩則, 岩崎 美樹, 佐藤 智美, 政井 一郎, 西脇 優子, 田中 英臣, 佐藤 淳, 野島 康弘, 岡本 仁, ゼブラフィッシュ後脳の顔面運動神経細胞の移動に必要な遺伝子の同定, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003,12

相澤 秀紀, 宮下 俊雄, 安藤 秀樹, 岡本 仁, ゼブラフィッシュの脳の左右差, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 日本, 2003,12

平手 良和, 岡本 仁, 新規 FGF シグナル活性化因子 Canopy, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 日本, 2003,12

西脇優子, 小森敦子, 相良 洋, 鈴木えみ子, 野島康弘, 和田浩則, 田中英臣, 岡本 仁, 政井一郎, 視細胞外節形成に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体 twilight の解析, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003.12

山口雅裕, 藤森典子, 小森敦子, 前田 龍, 李 海昌, 野島康弘, 岡本 仁, 政井一郎, 網膜幹細胞が過剰増殖するゼブラフィッシュ突然変異体 it ascending and descending の解析, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003.12

武内 昌哉, Clarke, J.D., Wilson, S. W., 岡本 仁, 政井一, Nodal, FGF シグナル Vax 転写因子の制御とその眼柄領域特異化のメカニズム, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003.12

前田 龍, 小倉 久美, 小林 恵実, 田中 英臣, 李 海昌, 山口 雅裕, 政井 一郎, 岡本 仁, ゼブラフィッシュ三叉運動神経の軸索伸長に異常を示す変異体群の解析, 第 9 回小型魚類研究会, 和光, 日本, 2003,9

野島 康弘, 李 海昌, 前田 龍, 田中 英臣, 和田 浩則, 西脇 優子, 政井 一郎, 川上 厚志, 岡本 仁, 側線神経に異常を示す変異体の解析および原因遺伝子のマッピング, 第 9 回小型魚類研究会, 日本, 2003,9

李 海昌, 政井 一郎, 野島 康弘, 小森 敦子, 田中 英臣, 西脇 優子, 和田 浩則, 岡本 仁,

Characterization of kaitou(kat), a mutant affecting neural tube morphogenesis in zebrafish, 第9回小型魚類研究会, 和光,2003,9

江本 裕美, 岡本 仁, 工藤 明, 今井 義幸, ゼブラフィッシュ血管突然変異体 bjm(blood jam)の解析, 第9回小型魚類研究会, 和光,2003,9

和田 浩則, 岩崎 美樹, 佐藤 智美, 政井 一郎, 西脇 優子, 田中 英臣, 佐藤 淳, 野島 康弘, 岡本 仁, ゼブラフィッシュの顔面運動神経細胞の移動に必要な遺伝子群の単離, 第9回小型魚類研究会, 和光,2003,9

佐藤 淳, 佐藤 美紀, 和田 浩則, 坪崎 陽一郎, 田中 英臣, 西脇 優子, 政井 一郎, 野島 康弘, 岩崎 美樹, 川上 厚志, 岡本 仁, 上鰓神経節の形成に異常を示す変異体 nep の原因遺伝子マッピングと、運動神経軸索の形成に異常を示す変異体 epr の原因遺伝子クローニング, 第9回小型魚類研究会和光,2003,9

田中 英臣, 前田 龍, 韓 昌均, 和田 浩則, 政井 一郎, 西脇 優子, 野島 康弘, 岡本 仁, ゼブラフィッシュ突然変異系統を用いた三叉運動神経の発生機構の解析, 第9回小型魚類研究会, 和光,2003,9

Aizawa Hidenori, Ando Hideki, Concha Miguel, L.,Barth K. Anukampa, Wilson Steve W., Okamoto Hitoshi, Left-right asymmetry of the habenulo-interpeduncular projection in zebrafish brain, International Symposium on Dynamics of Neural Development Osaka University, Toyonaka, Japan,2003,8

Hirate Yoshikazu, Okamoto Hitoshi, The role of a novel secreted protein Canopy1 in FGF signaling, International Symposium on Dynamics of Neural Development, Osaka University, Toyonaka,Japan,2003,8

Tanaka Hideomi, Maeda Ryu, Han Chang Gyun, Wada Hironori, Masai Ichiro, Nishiwaki Yuko, Nojima Yasuhiro, Okamoto Hitoshi,, Genetic analysis of cell migration and axonal pathfinding of trigeminal motor neurons in zebrafish, International Symposium on Dynamics of Neural Development, Osaka University, Toyonaka,,Japan,2003,8

Uemura Osamu, Okada Yohei, Ando Hideki, Higashijima Shin-ichi, Chino Naoichi, Shimazaki Takuya, Okano Hideyuki, Okamoto Hitoshi, Evolutionally conserved enhancers recapitulate the Islet-1 gene expression in the developing spinal motor neurons, International Symposium on Dynamics of Neural Development, Osaka University, Toyonaka,Japan,2003,8

Wada Hironori, Iwasaki Miki, Sato Tomomi, Masai Ichiro, Nishiwaki Yuko, Tanaka Hideomi, Sato Atsushi, Nojima Yasuhiro, Okamoto Hitoshi, Search for genes required for the migration of facial motor neurons in zebrafish, International Symposium on Dynamics of Neural Development, Osaka University, Toyonaka,Japan,2003,8

植村 修,岡田 洋平,東島 眞一,安藤 秀樹,千野 直一,島崎 琢也,岡野 栄之,岡本 仁, 進化的に保存されている Islet-1 遺伝子の脊髄運動神経における転写制御, 第 26 回日本神経科学大会, 名古屋, 日本, 2003, 7

和田 浩則, 岩崎 美樹, 佐藤 智美, 政井 一郎, 西脇 優子, 田中 英臣, 佐藤 淳, 野島 康弘, 岡本 仁, ゼブラフィッシュの顔面神経細胞の移動に必要な遺伝子の同定, 第 26 回日本神経科学大会, 名古屋, 日本, Japan, 2003, 7

前田(佐藤)美香、帯刀益夫、東海林互: 脊髄一時運動神経の軸索伸展に対する Sema3A1 の影響, 第 36 回日本発生生物学会大会, 札幌, 2003.6

依山寛司、帯刀益夫、東海林互: ゼブラフィッシュ・ニューロピリン 1・プロモーターの同定, 第 36 回日本発生生物学会大会, 札幌, 2003.6

岩崎 美樹, 和田 浩則, 伊藤 梨絵, 佐藤 智美, 政井 一郎, 西脇 優子, 田中 英臣, 佐藤 淳, 野島 康弘, 岡本 仁, ゼブラフィッシュの顔面神経細胞の移動に必要な遺伝子の同定, 日本発生生物学会第 36 回大会, 札幌, 2003, 6

前田 龍, 小倉 久美, 田中 英臣, 李 海昌, 山口 雅裕, 政井 一郎, 岡本 仁, ゼブラフィッシュ三叉運動神経の軸索伸長に異常を示す変異体群の解析, 日本発生生物学会第 36 回大会, 札幌, 2003, 6

李 海昌, 政井 一郎, 野島 康弘, 小森 敦子, 田中 英臣, 西脇 優子, 和田 浩則, 岡本 仁, Characterization of *kaitou(kat)*, a mutant affecting neural tube morphogenesis in zebrafish, Characterization of *kaitou(kat)*, a mutant affecting neural tube morphogenesis in zebrafish, 日本発生生物学会第 36 回大会, 札幌, 2003, 6

野島 康弘, 松山 剛暢, 李 海昌, 前田 龍, 田中 英臣, 和田 浩則, 西脇 優子, 政井 一郎, 川上 厚志, 岡本 仁, 側線神経に異常を示す突然変異体の単離および解析, 日本発生生物学会第 36 回大会, 札幌, 2003, 6

平手 良和, 岡本 仁, 新規遺伝子 *canopy* の FGF シグナルへの関与, 日本発生生物学会第 36 回大会, 札幌, 日本, 2003, 6

江本 裕美, 岡本 仁, 工藤 明, 今井 義幸, ゼブラフィッシュ血管突然変異体 *bjm(blood jam)* の解析, 日本発生生物学会第 36 回大会, 札幌, 日本, 2003, 6

和田 浩則, 岩崎 美樹, 伊藤 梨絵, 佐藤 智美, 政井 一郎, 西脇 優子, 田中 英臣, 佐藤 淳, 野島 康弘, 岡本 仁, ゼブラフィッシュの突然変異体を用いた顔面神経核形成機構の解析, 日本発生生物学会第 36 回大会, 札幌, 日本, 2003, 6

佐藤 淳, 和田 浩則, 坪崎 陽一郎, 田中 英臣, 西脇 優子, 政井 一郎, 野島 康弘, 岩崎 美樹, 川上 厚志, 岡本 仁, GFP 発現トランスジェニック・ゼブラフィッシュを用いた鰓弓神経節, 運動神経軸索の形成に関わる変異体の解析と原因遺伝子マッピング, 日本発生生物学会第 36 回大会, 札幌, 日本, 2003, 6

前田(佐藤)美香, 帯刀益夫, 東海林互: 脊髄一時運動神経の軸索伸展に対する Sema3A1 の影響, 第 36 回日本発生生物学会大会, 札幌, 2003. 6

依山寛司, 帯刀益夫, 東海林互: ゼブラフィッシュ・ニューロピリン 1・プロモーターの同定, 第 36 回日本発生生物学会大会, 札幌, 2003. 6

依山寛司, 前田(佐藤)美香, 帯刀益夫, 東海林互, 軸索ガイダンスレセプター、ニューロピリン-1(nrp-1)の発現を制御するシスエレメントの解析, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003. 6

田中英臣, 和田浩則, 政井一郎, 西脇優子, 前田龍, 韓昌均, 野島康弘, 岡本仁 ゼブラフィッシュの突然変異体を用いた三叉運動神経の細胞移動および軸索伸展機構の解析, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2002, 12

和田浩則, 政井一郎, 西脇優子, 田中英臣, 吉澤あすか, 佐藤淳, 野島康弘, 岩崎美樹, 岡本仁 ゼブラフィッシュを用いた運動神経細胞の移動機構にかかわる突然変異体の系統的単離, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2002, 12

田中英臣, 和田浩則, 政井一郎, 西脇優子, 下田修義, 小森敦子, 中尾和加子, 中山里実, 内山学, 佐藤淳, 野島康弘, 浜岡崇憲, 岩崎美樹, 名和妙美, 鶴岡佐知子, 佐藤美紀, 岡本仁 チューブリン染色による脊髄神経回路形成に関わる突然変異体の単離・解析, 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001. 12

西脇優子, 小森敦子, 斉藤かおり, 野島康弘, 和田浩則, 田中英臣, 岡本仁, 政井一郎 視細胞変性を起こすゼブラフィッシュ突然変異体 twilight, eclipse の解析, 第 25 回日本分子生物学会年会 横浜, 2002. 12

佐藤淳, 和田浩則, 政井一郎, 西脇優子, 田中英臣, 小森敦子, 吉澤あすか, 野島康弘, 岩崎美樹, 岡本仁 ゼブラフィッシュ突然変異体を用いた鰓弓神経節の形成機構の解析, 第 35 回日本発生生物学会大会, 横浜, 2002. 5

佐藤淳, 和田浩則, 政井一郎, 西脇優子, 田中英臣, 小森敦子, 吉澤あすか, 野島康弘, 岩崎美樹, 岡本仁 GFP 発現トランスジェニック・ゼブラフィッシュを用いた感覚神経節, 運動神経軸索の形成に関わる変異体の単離, 第 8 回小型魚類研究会, 三島, 2002. 8

田中英臣, 和田浩則, 政井一郎, 西脇優子, 前田龍, 李海昌, 佐藤淳, 野島康弘, 岩崎美樹, 岡本仁 freeze frame と sidewalk は三叉運動神経の移動と軸索伸展に異常が認められるゼブラフィッシュの変異系統である, 第 8 回小型魚類研究会, 三島, 2002, 8

和田浩則, 政井一郎, 西脇優子, 田中英臣, 吉澤あすか, 佐藤淳, 野島康弘, 岩崎美樹, 岡本仁 ゼブラフィッシュ突然変異体をもちいた神経細胞の移動機構の解析, 第 8 回小型魚類研究会, 三島, 2002. 8

安藤秀樹 ケージド mRNA 法による LH2A の機能解析, 第 8 回小型魚類研究会, 三島, 2002, 8

田中英臣, 和田浩則, 政井一郎, 西脇優子, 前田龍, 李海昌, 佐藤淳, 野島康弘, 岩崎美樹, 小森敦子, 岡本仁 ゼブラフィッシュの突然変異体を用いた三叉運動神経の軸索伸展機構の解析, 第 35 回日本発生生物学会大会, 横浜, 2002. 5

西脇優子, 政井一郎, 和田浩則, 田中英臣, 小森敦子, 野島康弘, 岡本仁 ゼブラフィッシュ網膜における視細胞分化と機能維持に関する突然変異体の解析, 第 35 回日本発生生物学会年会 横浜 2002. 5

東海林互, 前田(佐藤)美香, 帯刀益夫: 背側大動脈を形成する血管内皮細胞の移動経路. 第 35 回日本発生生物学会大会, 横浜 2002. 5

前田(佐藤)美香, 帯刀益夫, Kuwada, J.Y.: 東海林互: 脊髄一時運動神経の Sema3A1 に対する感受性変化, 第 35 回日本発生生物学会大会, 横浜 2002. 5

田中英臣, 和田浩則, 政井一郎, 西脇優子, 下田修義, 小森敦子, 中尾和加子, 中山里実, 内山学, 佐藤淳, 野島康弘, 浜岡崇憲, 岩崎美樹, 名和妙美, 鶴岡佐知子, 佐藤美紀, 岡本仁 ゼブラフィッシュの三叉・顔面運動神経の軸索伸展様式の解析と突然変異単離, 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001. 12

政井一郎, 西脇優子, 和田浩則, 田中英臣, 下田修義, 小森敦子, 仲田明日香, 伊与部誠, 中尾和加子, 中山里実, 内山学, 佐藤淳, 野島康弘, 浜岡崇憲, 岩崎美樹, 名和妙美, 鶴岡佐知子, 佐藤美紀, 岡本仁 チューブリン抗体染色法によるゼブラフィッシュ網膜分化に関わる突然変異の単離, 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001. 12

西脇優子, 政井一郎, 和田浩則, 田中英臣, 下田修義, 小森敦子, 中尾和加子, 中山里実, 内山学, 佐藤淳, 野島康弘, 浜岡崇憲, 岩崎美樹, 名和妙美, 鶴岡佐知子, 佐藤美紀, 岡本仁 視運動性眼振運動を利用した視細胞に異常のあるゼブラフィッシュ突然変異体の検出, 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001. 12

(3)特許

国内出願(1件)

発明者:岡本仁、東島伸一、植村修

発明の名称:運動神経細胞・感覚神経細胞特異的エンハンサー、2002-254829

出願人:岡本仁、東島伸一、植村修

(4)受賞等

受賞

なし

新聞報道

- ・日本経済新聞(夕刊)2001.07.24「遺伝子の働き 制御自在」
- ・朝日新聞(夕刊)2001.07.25「狙った遺伝子だけ働かせる技術開発」
- ・読売新聞(夕刊)2001.08.06「遺伝子機能 魚で解明へ」
- ・日経バイオテク 2001.07.30「理研、東邦大・光照射で自記・部位特異的な遺伝子の強制発現手法を開発」
- ・日本工業新聞 2001.09.26「超への挑戦 171 回」
- ・日刊工業新聞 2002.01.04「1400g の小宇宙 脳のなぞに迫る」
- ・日刊工業新聞 2002.01.17「小さな脳が役割」
- ・日経産業新聞 2005.1.20「脳内の神経回路 左右で非対称に」
- ・化学工業日報 2005.1.20「脳の左右差形成メカニズム 分子レベルで解明」
- ・日刊工業新聞 2005.10.20「脳の左右差の形成期工 分子レベルで解明」
- ・毎日新聞 2005.1.22「魚の脳も非対称」
- ・読売新聞 2005.1.26「魚の脳にも左右非対称の神経」
- ・毎日新聞 2005.11.30「左半身は、なぜ右脳が制御？」

その他

なし

(5) その他特記事項

なし

6 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

caged mRNA 技術講習会

(2) 招聘した研究者等

なし

7 結び

ゼブラフィッシュのゲノム・プロジェクトの進行が予想以上に遅れ、現在も完了していない。そのため、原因遺伝子の同定は、当初の予想よりも手間がかかった。しかし、現在重要な複数の突然変異に関しては、原因遺伝子の同定にまでたどり着くことができた。集中的資本投入が可能であった5年間という期間内には、とにかく一つでも多くの重要な突然変異のポジショナルクローニングを目指した。それぞれの遺伝子の機能的理解については、これから更に深めていかなければならないものも残っている。

システムの立ち上げから、突然変異の同定、系統としての樹立、ポジショナルクローニングによる原因遺伝子の同定まで、全てを5年間でやり遂げることができたのは、各研究員の努力もさることながら、優秀なテクニカルスタッフの支援のおかげである。

さらに、多大な経済的援助とともに全期間を通じて様々なサポートを続けてくださった、JSTとそのスタッフの方々、堀田凱樹統括をはじめとする評価委員の先生方に、深い感謝を表します。



テクニカルスタッフ

CREST 研究員を含むラボメンバーや
共同研究者の皆さん

