

## 共同研究報告書

○研究課題：脊椎動物の骨格筋の形成・成熟・維持機構の研究

○研究代表者：国立遺伝学研究所教授 川上 浩一  
再生医科学研究所共同研究者：瀬原 淳子

○研究期間：長期研究課題

○研究経過及び研究成果：

筋形成および骨格筋と腱の相互作用に関する共同研究を進めている。

川上グループで、トランスポゾン Tol2 を用いて GFP が挿入されたトランスジェニックフィッシュを確立し、その中で骨格筋や腱で発現しているラインを川上グループと瀬原グループで解析している。骨格筋で発現する 1 ラインに関して、筋形成に関わることがわかったことから、ほ乳類でも同様のメカニズムが働いているかどうかを調べるために マウス筋衛星細胞 C2C12 にこの遺伝子に対する siRNA を導入し、筋形成に対する効果を調べた。現段階では、C2C12 の筋形成には目立った変化はみられていない。一方、腱で発現する 1 ラインに関しては、挿入部位を決定したところ転写因子の上流領域であることが判明し、この転写因子がマウスでも類似の発現パターンを示すことがわかった。この転写因子の筋形成や腱形成、あるいはこれらの相互作用における役割は不明であることから、引き続きこの遺伝子の役割に関して調べているところである。

○研究成果の公表

1. Yagita K, Horie K, Koinuma S, Nakamura W, Yamanaka I, Urasaki A, Shigeyoshi Y, Kawakami K, Shimada S, Takeda J, Uchiyama Y. (2010) Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107, 3846-3851.
2. Takeuchi M, Kaneko H, Nishikawa K, Kawakami K, Yamamoto M, Kobayashi M. (2010) Efficient transient rescue of hematopoietic mutant phenotypes in zebrafish using Tol2-mediated transgenesis. *Dev. Growth Differ.*, 52, 245-250.
3. Kotani T, Iemura S, Natsume T, Kawakami K, Yamashita M. (2010) Mys Protein Regulates Protein Kinase A Activity by Interacting with Regulatory Type I  $\alpha$  Subunit during Vertebrate Development. *J Biol. Chem.*, 285, 5106-5116.
4. Yagita K, Yamanaka I, Emoto N, Kawakami K, Shimada S. (2010) Real-time monitoring of circadian clock oscillations in primary cultures of mammalian cells using Tol2

- transposon-mediated gene transfer strategy. *BMC Biotechnology*, 10(1), 3.
5. Kajita M, Hogan C, Harris AR, Dupre-Crochet S, Itasaki N, Kawakami K, Charras G, Tada M, Fujita Y. (2010) Interaction with surrounding normal epithelial cells influences signalling pathways and behaviour of Src-transformed cells. *J Cell Sci.*, 123, 171-180.
  6. Appelbaum L, Wang GX, Maro GS, Mori R, Tovin A, Marin W, Yokogawa T, Kawakami K, Smith SJ, Gothilf Y, Mignot E, Mourrain P. (2010) Sleep-wake regulation and hypocretin-melatonin interaction in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 21942-21947.
  7. Sugiyama M, Sakaue-Sawano A, Iimura T, Fukami K, Kitaguchi T, Kawakami K, Okamoto H, Higashijima SI, Miyawaki A. (2009) Illuminating cell-cycle progression in the developing zebrafish embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 20812-20817.
  8. Komisarczuk AZ, Kawakami K, Becker TS. (2009) Cis-regulation and chromosomal rearrangement of the *fgf8* locus after the teleost/tetrapod split. *Dev. Biol.*, 336(2), 301-312.
  9. Asakawa K, Kawakami K. (2009) The Tol2-mediated Gal4-UAS method for gene and enhancer trapping in zebrafish. *Methods*, 49(3), 275-281.
  10. Suster ML, Sumiyama K, Kawakami K. (2009) The Tol2-mediated Gal4-UAS method for gene and enhancer trapping in zebrafish. *BMC Genomics*, 16;10, 477.
  11. Picker A, Cavodeassi F, Machate A, Bernauer S, Hans S, Abe G, Kawakami K, Wilson SW, Brand M. (2009) Dynamic coupling of pattern formation and morphogenesis in the developing vertebrate retina. *PLoS Biol.*, 7(10) e1000214.
  12. Kim DJ, Seok SH, Baek MW, Lee HY, Na YR, Park SH, Lee HK, Dutta NK, Kawakami K, Park JH. (2009) Estrogen-responsive transient expression assay using a brain aromatase-based reporter gene in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Med.*, 59(5), 416-423.
  13. Mejia-Pous C, Viñuelas J, Faure C, Koszela J, Kawakami K, Takahashi Y, Gandrillon O. (2009) A combination of transposable elements and magnetic cell sorting provides a very efficient transgenesis system for chicken primary erythroid progenitors. *BMC Biotechnology*, 18;9(1), 81.
  14. Kim DJ, Seok SH, Baek MW, Lee HY, Na YR, Park SH, Lee HK, Dutta NK, Kawakami K, Park JH. (2009) Developmental toxicity and brain aromatase induction by high genistein concentrations in zebrafish embryos. *Toxicol. Mech. Methods*, 19(3), 251-256.
  15. Koide T, Miyasaka N, Morimoto K, Asakawa K, Urasaki A, Kawakami K, Yoshihara Y. (2009) Olfactory neural circuitry for attraction to amino acids revealed by transposon-mediated gene trap approach in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 9884-9889.
  16. Suster ML, Kikuta H, Urasaki A, Asakawa K, Kawakami K. (2009) Transgenesis in zebrafish with the tol2 transposon system. *Methods Mol. Biol.*, 561, 41-63.

17. Kitaguchi T, Kawakami K, Kawahara A. (2009) Transcriptional regulation of a myeloid-lineage specific gene lysozyme C during zebrafish myelopoiesis. *Mech. Dev.*, 126, 314-323.
18. Kim DJ, Seok SH, Baek MW, Lee HY, Na YR, Park SH, Lee HK, Dutta NK, Kawakami K, Park JH. (2009) Benomyl induction of brain aromatase and toxic effects in the zebrafish embryo. *J Appl. Toxicol.*, 29(4), 289-294.
19. Urasaki A, Kawakami K. (2009) Analysis of genes and genome by the tol2-mediated gene and enhancer trap methods. *Methods Mol. Biol.*, 546, 85-102.
20. Kikuta H, Kawakami K. (2009) Transient and stable transgenesis using tol2 transposon vectors. *Methods Mol. Biol.*, 546, 69-84.
21. Esaki M, Hoshijima K, Nakamura N, Munakata K, Tanaka M, Ookata K, Asakawa K, Kawakami K, Wang W, Weinberg ES, Hirose S. (2009) Transient and stable transgenesis using tol2 transposon vectors. *Dev. Biol.*, 329, 116-129.
22. 浦崎明宏, 浅川和秀, 川上浩一(2009) メダカトランスポゾン Tol2 が開く新しいゼブラフィッシュ研究、細胞工学, 28, 586-591.

#### 学会発表

1. Kawakami, K.. From gene to function: a quest with a transposon. zebrafish 2010: 11th Australia & New Zealand Workshop. 2010.2.3~5, Sydney, Australia.
2. Kawakami, K.. Genetic methods using the Tol2 transposable element in zebrafish. International Symposium on Marine Genomics 2009. 2009.12.15-18, 那覇市
3. Asakawa, K., et al. Role of the hindbrain in embryonic motility and location. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜市
4. Morita, R., et al. Jagged-Notch signaling regulates patterning activity and structural role of the Notochord through control of cell differentiation. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜市
5. Yano, T., et al. Mechanism of pectoral fin development in zebrafish using //prx1// limb-specific enhancer activity. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜市
6. Tanino, S., et al. Gene trap revealed a roll of Sox5 in the morphogenesis of the semicircular canal. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜市
7. Takeuchi, M., An easy and effective approach to rescue zebrafish mutant phenotypes via transient transgenesis using Tol2 constructs. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜市
8. Agetsuma, M., et al. Genetic inactivation of the habenulo-interpeduncular projection enhances the conditioned fear response in zebrafish. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜市

9. Yoshida, J., et al. Insertional mutagenesis of the mouse ES cell genome with the Tol2 transposon. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜市
10. 川上浩一. 光るゼブラフィッシュリソース, NBRP シンポジウム「NBRP が提供するミュータントリソース」, 2009.12.9, 横浜市
11. 浦崎明宏, 他. Tol2 を用いたゼブラフィッシュ遺伝子の網羅的破壊, 日本遺伝学会 第 81 回大会, 2009.9.16-18, 松本市
12. 揚妻正和, 他. 手綱核・脚間核路の遺伝学的破壊はゼブラフィッシュの恐怖反応を昂進させる, 第 32 回日本神経科学大会, 2009.9.16-18, 名古屋市
13. 武藤彩, 他. カルシウムイメージング法を用いたゼブラフィッシュ機能的神経回路の可視化, 第 32 回日本神経科学大会, 2009.9.16-18, 名古屋市
14. 小出哲也, 他. アミノ酸への誘因行動を司るゼブラフィッシュ嗅覚神経回路の遺伝学的解析, 第 32 回日本神経科学大会, 2009.9.16-18, 名古屋市
15. 吉田綾子, 他. 子宮内穿孔法と Tol2 トランスポゾンシステムを用いてグリア細胞特異的に遺伝子を発現させる方法の開発, 第 32 回日本神経科学大会, 2009.9.16-18, 名古屋市
16. 喜多善亮, 他. 小脳を構成するニューロンとグリアの発生一子宮内電気穿孔法を用いた網羅的解析一, 第 32 回日本神経科学大会, 2009.9.16-18, 名古屋市
17. 武藤彩, 他. ゼブラフィッシュ運動系における機能的神経回路の可視化, 第 15 回小型魚類研究会, 2009.9.12 -13, 名古屋市
18. 浅川和秀, 他. 触覚刺激に対する逃避行動の発達における後脳の役割, 第 15 回小型魚類研究会, 2009.9.12 -13, 名古屋市
19. 小出哲也, 他. アミノ酸への誘因行動を介在するゼブラフィッシュ嗅覚神経回路の遺伝学的解析, 第 15 回小型魚類研究会, 2009.9.12-13, 名古屋市
20. 竹内未紀, 他. Tol2 システムを利用した一過性レスキュー解析, 第 15 回小型魚類研究会, 2009.9.12-13, 名古屋市
21. 阿部玄武, 他. IRES を用いた Tol2 トランスポゾンによる遺伝子トラップ法の開発, 第 15 回小型魚類研究会, 2009.9.12-13, 名古屋市
22. 池永隆徳, 他. ゼブラフィッシュ脊髄での *pax8* 遺伝子の発現パターンと回路形成における役割, 第 15 回小型魚類研究会, 2009.9.12-13, 名古屋市
23. Suster, M.L., et al. Botulinum Neurotoxin transgenic zebrafish for dissecting neuronal circuits in vivo and creating novel variants for neurotherapeutics. 46th Congress of the European Societies of Toxicology, 2009.9.13-16, Dresden, Germany.
24. 矢野十織, 他. Apical fold morphogenesis in zebrafish fin; differences from tetrapod limb development. 16th International Society of Developmental Biologists Congress, 2009.9.9-10, Edinburgh, Scotland.
25. Okamoto, H., et al. Functional analysis of the habenula in control of fear. The 4th

- Asia-Oceania Zebrafish Meeting, 2009.8.31-9.2, Jeju, Korea.
26. Kawakami, K. Transposon-mediated gene trapping, enhancer trapping and insertional mutagenesis. The 4th Asia-Oceania Zebrafish Meeting, 2009.8.31-9.2, Jeju, Korea.
  27. 川上浩一. 生命の不思議を解き明かす光るゼブラフィッシュ, ゲノムひろば 2009 in アキバ・ゲノム研究勢ぞろい, 2009.8.1-2, 東京都
  28. Agetsuma, M., et al. Functional analysis of the habenula in control of fear. 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009.7.15-19, Rome, Italy.
  29. Han, HW., et al. Transgenic zebrafish Tg(Nogo-B:GFP) line recapitulates the Nogo-B expression pattern in diverse tissues including the liver and intestine. 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009.7.15-19, Rome, Italy.
  30. Appelbaum, L., et al. Hypocretin interacts with melatonin in regulating sleep in zebrafish. 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009.7.15-19, Rome, Italy.
  31. Cheng, C. H., et al. A novel zebrafish cyclin dx gene: expression profile, requirement for the development of primordium motor neuron, pmn and characterization of its promoter region. 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009.7.15-19, Rome, Italy.
  32. Ono, F., et al. Formation of spinal network dependent on domain-specific Pax genes. 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009.7.15-19, Rome, Italy.
  33. Urasaki, A., et al. The gene trap approach reveals involvement of mekk3b in the functional blood vessel formation. 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009.7.15-19, Rome, Italy.
  34. Santoriello, C., et al. Expression of H-RASV12 in a zebrafish model of Costello syndrome causes cellular senescence in adult proliferating cells. 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009.7.15-19, Rome, Italy.
  35. Kawakami, K. Tol2-mediated transgenesis in zebrafish and mice. Conference on Genome Engineering, 2009.6.25-27, Minneapolis, USA.
  36. 矢野十織, 他. ゼブラフィッシュ胸鰭末端上皮の形態形成. 第6回 東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 2009.6.16, 仙台市
  37. 川上浩一, zTrap: zebrafish gene trap and enhancer trap database. データベースが拓くこれからのライフサイエンス, 2009.6.12, 東京都
  38. Abe, G. et al. The zebrafish cdc73 is essential for embryogenesis and expression of fgf24 in pectoral fin development. 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2009.5.28-31, 新潟市
  39. Lal, P. et al. Characterization of gene trap and enhancer trap transgenic zebrafish lines that express Gal4 in specific region of brain in adult stage. 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2009.5.28-31, 新潟市

40. Yano, T., et al. Apical fold morphogenesis of pectoral fin in zebrafish. 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2009.5.28-31, 新潟市
41. Yoshida, A., et al. An effective and convenient method to express transgene by the combination of in utero electroporation and the Tol2 transposon system; inducible or cell-type specific expression in glia. 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2009.5.28-31, 新潟市
42. Agetsuma, M., et al. Genetic inactivation of the asymmetric habenulo-interpeduncular projection enhances the conditioned fear response in zebrafish. The 2009 meeting on Synapses: from molecules to circuits & behavior, Cold Spring Harbor Laboratory, 2009.4.14-18, New York, USA.