

博士論文番号：1581023

ゼブラフィッシュを用いた脳形成における
Rab33 の機能解析

黄 利国

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 神経システム生物学研究室
(稲垣 直之 教授)

平成 30 年 9 月 14 日提出

目次

	ページ番号
序論	・・・ 3
材料と方法	・・・ 7
結果	・・・ 15
考察	・・・ 33
謝辞	・・・ 38
参考文献	・・・ 39

序論

生物の脳は分子、細胞の集合に過ぎないにもかかわらず、体外と体内の環境から情報を収集処理し、生命を維持し、生体の運動をコントロールすることができる。このような脳機能を実現するためには、膨大な量の神経細胞が高度に発達した神経回路を形成する必要がある。神経回路を構成する神経細胞は、軸索と樹状突起という2種類の神経突起を有している (Winckler and Mellman, 1999)。軸索は神経細胞の細胞体から出る一本の長い突起であり、神経伝達物質を標的細胞に放出して、標的細胞にシグナルを伝達する役割を担っている。一方、樹状突起は細胞体から樹木の枝のように分岐した複数の突起であり、他の神経細胞の軸索から放出された神経伝達物質を受け取り、電気的な興奮に変換する役割を担っている。このように、神経回路の形成には、神経突起の伸長が不可欠であると考えられる。

この神経突起の伸長には、膨大な量の膜成分が必要であると考えられる。軸索の形成および伸長過程では、直径 $1\ \mu\text{m}$ の軸索が $20\sim 50\ \mu\text{m}/\text{h}$ の割合で伸長する (Pfenninger, 2009)。面積へ換算すると、軸索の表面積が $60\sim 150\ \mu\text{m}^2/\text{h}$ 増加することを意味する。このような表面積の拡大を補うためには、細胞内合成された膜成分が小胞輸送により、ゴルジ装置から恒常的に突起先端へ輸送されることが不可欠であると考えられている (Futerman and Banker, 1996; Pfenninger, 2009; Tang, 2001; Zhang *et al.*, 2006)。軸索の膜の拡大は、細胞体の粗面小胞体やゴルジ装置における膜の合成、軸索に沿った輸送、成長円錐での小胞のエクソサイトosisなどの、複数のプロセスにより仲介される (Craig and Banker, 1994; Futerman and Banker, 1996; Lockerbie *et al.*, 1991; Pfenninger, 2009)。細胞内の神経伝達物質の輸送と膜輸送は、細胞内の小胞輸送の制御に関する Rab タンパク質という一群のタンパク質に依存している (Geppert *et al.*, 1994; Pfenninger, 2009; Stenmark, 2009)。

Rab ファミリータンパク質について

Rab ファミリータンパク質の最初のメンバーは 1980 年代に酵母で同定された (Gallwitz *et al.*, 1983; Schmitt *et al.*, 1986)。Rab タンパク質は哺乳動物に至るすべての真核生物に保存され、これまでにヒトにおいて 66 種類の Rab のアイソフォームが知られている (Kenyon *et al.*, 2015; Klöpper *et al.*, 2012)。Rab タンパク質は GTP の結合と加水分解に関与する G ドメインと細胞内局在を調節する C 末端の CAAX モチーフを持っている (Stenmark, 2009)。Rab タンパク質は、Ras スーパーファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質である。Rab タンパク

質は、GTP 結合型の活性化型と GDP 結合型の不活性化型をサイクルすることで、分子スイッチとして細胞内の小胞輸送を制御する (Fukuda, 2008; Pfeffer, 2001; Stenmark, 2009; Zerial and McBride, 2001; Zhen and Stenmark, 2015)。GTP 結合型の活性化型の Rab タンパク質は、特異的なエフェクター (sorting adaptor, tethering factor, kinase, phosphatase, motor protein など) をリクルートし、それら分子を活性化して、小胞輸送の特異性と方向性を制御する (Fukuda, 2008; Stenmark, 2009; Zerial and McBride, 2001; Zhen and Stenmark, 2015)。これまでの研究により、Rab は神経細胞の形態形成においても重要な役割を果たしていることが知られている。例えば、Rab6、Rab11、Rab21、Rab35 など複数の Rab タンパク質は神経突起の形成や伸長過程に関与することが報告されている (Burgo *et al.*, 2009; Eva *et al.*, 2010; Kobayashi and Fukuda, 2012; Schlager *et al.*, 2010)。

Rab33a について

はじめての Rab33a は、GTP 結合タンパク質 S10 として、ヒトから同定された (Koda and Kakinuma, 1993)。ヒト由来の細胞株を用いたノーザンブロットにより、RAB33A が脳由来の細胞に多く発現し、リンパ球、メラニン細胞でも発現することが分かっている (Cheng *et al.*, 2006; Kobayashi and Fukuda, 2012)。また、培養海馬神経細胞を用いた研究により、Rab33a タンパク質はゴルジ装置から軸索先端への膜成分の輸送経路に沿って分布していることが報告されている (Nakazawa *et al.*, 2012)。Rab33a の発現を抑制した神経細胞では、軸索先端の細胞膜への膜成分の供給量が減少し、軸索の形成と伸長が抑制された (Nakazawa *et al.*, 2012)。一方、Rab33a を過剰に発現させた神経細胞では、複数の軸索が形成された (Nakazawa *et al.*, 2012)。これらの結果から、Rab33a はゴルジ装置で合成された細胞膜成分を軸索先端へ輸送し、軸索の形成と伸長を促進させることが示唆された (Nakazawa *et al.*, 2012)。さらに、Rab33a は、培養海馬神経細胞において過剰な軸索形成を抑える Singar1/Rufy3 と相互作用することが報告されている (Fukuda *et al.*, 2011; Mori *et al.*, 2007)。近年、Rab33a はオートファゴソームの形成を制御する分子 Atg16L1 と相互作用することも報告されている (Itoh *et al.*, 2008)。しかしながら、Rab33a が生体内での軸索伸長に関与するか否かについては明らかになっていない。

Rab33b について

Rab33a に加えて、Rab33b が存在し、Rab33b がマウスの組織を用いたノーザンブロットにより、脳、心臓、肝臓、胃、腸など様々な組織で発現し (Zheng *et al.*, 1998)。Rab33b は細胞内において、ゴルジ装置に局在し、GM130, rabaptin-5 および rabex-5 などのゴルジタンパク質や相互作用することが報告されている

(Valsdottir *et al.*, 2001)。Rab33b は Rab33a と同様に、オートファゴソームの形成を制御する分子 Atg16L1 と相互作用することも報告されている (Itoh *et al.*, 2008)。さらに、近年、Smith-McCort 異形成症の患者から、RAB33B の変異が検出された (Alshammari *et al.*, 2012; Dupuis *et al.*, 2013; Salian *et al.*, 2017)。Smith-McCort 異形成症は、常染色体劣性骨軟骨異形成で、樽状胸を伴う短軀小人症、四肢短縮、後側弯脊椎、骨頭骨端の外側偏位、レース様腸骨を伴う小さな骨盤を含む特異的症状が特徴である (Smith *et al.*, 1958)。しかしながら、これまでに Rab33b 変異体動物モデルを用いた解析は行われておらず、その発生過程における機能については明らかになっていない。

ゼブラフィッシュについて

ゼブラフィッシュにおいては、3つの *rab33* 遺伝子 (*rab33a*, *rab33ba*, *rab33bb*) の存在が知られている (NIH-MGC EST Sequencing Project, unpublished; Hall *et al.*, 2017)。モデル脊椎動物であるゼブラフィッシュは (1) 胚が半透明で、(2) 体外で発生し、(3) 一度に多くの卵を産み、(4) 発生が早い。このように、ゼブラフィッシュは発生学および遺伝学的解析に優れた特徴を持つ。ゼブラフィッシュは *Tol2* トランスポゾンシステムによる遺伝子導入法が確立されており、特定の組織あるいは細胞で蛍光タンパク質を発現する魚を作製することが出来る (Urasaki *et al.*, 2006; Urasaki and Kawakami, 2009)。また、ヒトやマウスにおいて生体内を生きのまま観察することは難しいが、母体外で発生し、透明なゼブラフィッシュ胚を用いると、脳形成過程を詳細に観察することが可能である。最近、CRISPR/Cas9 システムを用いて、目的の遺伝子のゼブラフィッシュ変異体を作製する方法も開発された (Jao *et al.*, 2013)。本研究では、このようなゼブラフィッシュの利点を用いて、Rab33 の生体内での機能を明らかにすることを目的にした。

本研究では、ゼブラフィッシュを用いて、発生過程における *rab33* の発現および機能の解析を行った。系統樹解析により、ゼブラフィッシュの *rab33a* は哺乳類の *Rab33a* と、ゼブラフィッシュの *rab33ba* は哺乳類の *Rab33b* とそれぞれオースログであることが示唆された。しかし、*rab33bb* はゼブラフィッシュ以外の脊椎動物において保存されていなかった。そこで、本研究では特に *rab33a* と *rab33ba* に着目して、それらの機能解析を行った。遺伝子発現解析により *rab33a* と *rab33ba* は発生過程の脳で発現することがわかった。終脳の Dorsorostral cluster (DRC) の神経細胞は Anterior commissure (AC) へ、間脳の Ventrorostral cluster (VRC) の神経細胞は Postoptic commissure (POC) にそれぞれ軸索を伸ばすことが知られているが、*rab33a* と *rab33ba* は、DRC と VRC で発現していた。*rab33a*

$^{-/-};rab33ba^{-/-}$ 二重変異体において、AC と POC の太さは野生型と比べて、有意に減少していた。さらに、単一細胞標識解析により、 $rab33a^{-/-};rab33ba^{-/-}$ 二重変異体の AC における軸索の長さが野生型に比べて有意に減少していた。これらの結果から、ゼブラフィッシュの脳の発生過程において、Rab33a と Rab33ba は前脳交連の軸索伸長に関与することが示唆された。

材料と方法

ゼブラフィッシュの飼育

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は、飼育水 [0.03% 人工海水シーライフ (名東水園)、0.00001%メチレンブルー] 中で、常時雄と雌を隔離し、水温 28.5°C、明期 14 時間、暗期 10 時間の条件下で飼育した。エサは、28°Cで 24 時間以上エアレーションを行い孵化させたブラインシュリンプ (北村) と人工飼料おとひめ B2 (日清丸紅飼料) を用いた。受精卵は、暗期に入る前、網で隔離された同一の水槽に雄と雌を分けて、数匹ずつ入れ、次の明期に雄と雌を混ぜ合わせた。回収した受精卵は、28.5°C、E3 medium [50 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, 0.05% methylene blue (Nacalai tesque)] にて培養した。24 時間以降に観察する場合、胚の色素形成を阻害するために、0.0003%になるように PTU [1-phenyl-2-thiourea (東京化成)] を E3 medium を添加した。

RNA 抽出

目的の発生段階 (受精後 0 時間、24 時間、36 時間、48 時間) の胚 50 個に対して、TRIzol Reagent (Invitrogen) 1 ml を添加し、1 ml シリンジ (TERUMO) とテルモ注射針 23G (TERUMO) でサンプルを懸濁した。200 μ L クロロホルム (Nacalai tesque) を加え、懸濁した後に、15000 rpm で 10 分間遠心によって上層と下層に分離し、550 μ L 上層を回収した。回収した上層に 500 μ L イソプロパノール (Nacalai tesque) を加え、遠心によって沈殿を得た。沈殿に 75% エタノール (Nacalai tesque) を用いて洗浄した。この沈殿に対して 20 μ L の RNA Free Water (Nacalai tesque) を加え、懸濁した。1 μ L DNase (Promega) を加えて DNase 処理を行なった後、フェノール (Nacalai tesque) / クロロホルム処理、エタノール (Nacalai tesque) 沈殿を行い、RNA を精製した。

遺伝子配列の決定

前述の RNA を用いて、逆転写を行った。逆転写反応は、まず RNA テンプレート 1 μ g、10 pmol/ μ L AP プライマー (表 1 参照) 1 μ L、RNase free water (QIAGEN) を 14 μ L まで加え、70°C、5 分間加熱処理した後、5 分間氷上で急冷した。そして、M-MLV 5 \times Buffer 5 μ L、2.5 mM dNTPs 5 μ L、M-MLV RT (H-) Enzyme 1 μ L を加え、全量 25 μ L にして、40°Cで 10 分間反応させた後、45°Cで 90 分間反応させた。これを 70°Cで 15 分間反応させることにより酵素を失活させた。さらに、1 μ L RNase (Promega) を加えて、37°Cで 15 分間反応させた。これをゼブラフィッシュの cDNA サンプルとした。

遺伝子全長のクローニングは pGEM-T (Promega) ベクターを用いた。DNA 断片は受精後 48 時間胚から合成された cDNA 2 μ L を鋳型として、10x KOD plus neo buffer 5 μ L、dNTPs (2 mM each) 5 μ L、25 mM MgSO₄ 3 μ L、KOD plus neo (TOYOBO) 1 μ L、プライマー 0.15 mM、全量 50 μ L で PCR を行った。使用したプライマー (表 1 参照) については、*rab33a* は *rab33a - h* と *rab33a - t*、*rab33ba* は *rab33ba - h* と *rab33ba - t*、*rab33bb* は *rab33bb - h* と *rab33bb - t* を用いた。反応条件は 2 本鎖 DNA の熱変性を 98°C で 10 秒、アニーリングは表 4 の条件、DNA 伸長を 68°C で 30 秒行い、サイクル数は 40 回とした。得られた *rab33a*、*rab33ba*、*rab33bb* の DNA 断片を pGEM-T (Promega) ベクターにクローニングした。その産物を NEB5 α に導入し、100 μ g/ml アンピシリン入りの寒天培地で培養した。得られたコロニーを取って、アンピシリン入りの液体培地で 37°C、一晚培養した。その後、培養液を精製して、環状プラスミド pGEMT-*rab33a*、pGEMT-*rab33ba*、pGEMT-*rab33bb* を得た。前述のベクター:pGEMT-*rab33a*、pGEMT-*rab33ba*、pGEMT-*rab33bb* それぞれを鋳型として、プライマー exR2 あるいは exL2 (表 1 参照) と BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (life technologies) を用いて、塩基配列を確認した。

発現の確認

前述の cDNA (受精後 0 時間、24 時間、36 時間、48 時間胚) 0.4 μ L を鋳型として、10x KOD plus neo Buffer 1 μ L、dNTPs (2 mM each) 1 μ L、25 mM MgSO₄、KOD plus neo (TOYOBO) 0.2 μ L、プライマー 0.15 mM、全量 10 μ L で PCR を行った。使用したプライマー (表 1 参照) については、*rab33a* は *rab33a - h* と *rab33a - t*、*rab33ba* は *rab33ba - h* と *rab33ba - t*、*rab33bb* は *rab33bb - h* と *rab33bb - t* を用いた。反応条件は前述の条件で行った。

ベクターの構築

pCRII は、*in situ hybridization* 用 RNA プロブの作製に利用するプラスミドである。pCRII-*rab33a* は、プラスミド pGEMT-*rab33a* を *NotI* (NEB) と *BamHI* (NEB) で処理した後、pCRII ベクターの *NotI*-*BamHI* 部位と置き換えることにより構築した。pCRII-*rab33ba* は、プラスミド pGEMT-*rab33ba* を *NotI* (NEB) と *BamHI* (NEB) で処理した後、*rab33ba* 遺伝子を含む配列を pCRII ベクターの *NotI*-*BamHI* 部位と置き換えることにより構築した。pCRII-*rab33bb* はプラスミド pGEMT-*rab33bb* を *NotI* (NEB) と *BamHI* (NEB) で処理した後、*rab33bb* 遺伝子を含む配列を pCRII ベクターの *NotI*-*BamHI* 部位と置き換えることにより構築した。

pCS2 は、*in vitro* での mRNA の合成をするためのプラスミドである。pCS2-*rab33a* はプラスミド pGEMT-*rab33a* を *XbaI* (NEB) と *BamHI* (NEB) で処理した

後、*rab33a* 遺伝子を含む配列を pCS2 ベクターの *XbaI*-*BamHI* 部位と置き換えることにより構築した。pCRII-*rab33ba* は、プラスミド pGEMT-*rab33ba* を *XbaI* (NEB) と *BamHI* (NEB) で処理した後、*rab33ba* 遺伝子を含む配列を pCS2 ベクターの *XbaI*-*BamHI* 部位と置き換えることにより構築した。

***in situ* hybridization 用 RNA プローブの作製**

プラスミド pCRII-*rab33a*、pCRII-*rab33ba*、pCRII-*rab33bb* は、各 10 µg、制限酵素 *NotI* (アンチセンス)あるいは *BamHI* (センス) 2 µL、10×Buffer 2 µL、全量 20 µL の反応系で、37°Cで 1 時間反応させて、直鎖化した。Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON GENETICS) を用いて、DNA を精製した。*in vitro* 転写反応は、直鎖化プラスミド DNA 1 µg、Transcription Buffer 10x concentrated (Roche)、RNase inhibitor 0.5 µL (NEB)、SP6 / T7RNA polymerase 2 µL (Roche)、DIG RNA Labeling 10x conc (Roche) 2 µL を加え、全量 20 µL の反応系で、37°Cで 2 時間反応させた。サンプルの一部を電気泳動し、RNA probe の合成が行われていることを確認した。残りのサンプルを RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて精製した。得られた RNA プローブを Hybridization mix [60% Formamide (Nacalai tesque)、5× SSC [3 M NaCl (Nacalai tesque)、0.3 M クエン酸三ナトリウム二水和物 (Nacalai tesque) (pH 7.0)], 0.1% Tween20、0.0092 M Citric acid (Nacalai tesque)、50 µg/ml Heparin (SIGMA)、500 µg/ml tRNA (Roche)] に溶かし、-30°Cで保存した。

Whole mount *in situ* hybridization

目的の発生段階の胚を、4% (w/v) paraformaldehyde (PFA、Nacalai tesque) / PBS に浸し、4°Cで一晩固定処理を行なった。その後、卵膜を除去し、PBT [PBS、0.1% Tween20 (Nacalai tesque)] で 4 回洗浄した後、50% (v/v) メタノール (Nacalai tesque) / PBT および 100%メタノールに段階置換を行ない、-30°Cで保存した。ただし、受精後 24 時間胚以降の胚は卵膜を除去した後に固定し、メタノール置換を行なった。メタノール中に保存している胚を 50%メタノール / PBT に段階置換し、PBT で 4 回洗浄、再水和した。Proteinase K (Roche) を終濃度 10 µg/ml で加えた PBT 溶液で、37°Cで反応させた。反応時間については、受精後 24 時間の胚は 5 分、受精後 36 時間胚は 10 分、受精後 48 時間のサンプルは 15 分で行った。Proteinase K 処理後、PBT で 2 回洗浄を行い、Proteinase K を除去した。サンプルを PBS で希釈した 4% PFA で再固定した。PBT で 3 回洗浄後、Hybridization mix を加え、68°Cで 4 時間保温し、プレハイブリダイゼーションを行なった。その後、75 ng DIG-RNA probe を溶かした hybridization mix [60% Formamide、5×SSC (pH7.0)、0.1% Tween20、0.0092 M Citric acid、50 µg/ml Heparin、500 µg/ml tRNA] 500 µL に置換し、68°Cで一晩保温した。保温した胚を、100%、50% (v/v)

hybridization mix [60% Formamide、5×SSCT (pH6.8)、0.1% Tween20、0.0092 M Citric acid)] / 2×SSC および、100% 2×SSCT で、70°C、15 分置きに洗浄した。その後、0.2×SSC で、70°C、1 時間置きに洗浄した。更に、50% (v/v) 0.2×SSCT / PBT で室温、15 分置きに洗浄した。Blocking buffer [10% Blocking reagent (Roche) in MA buffer を PBST で 2%に希釈] を加え、室温に 4 時間以上置いた。その後、1 / 2000 Anti-digoxigenin-AP (Roche) in Blocking buffer の抗体液に置換し、4°Cで一晩反応させた。翌日、抗体液を除き、PBT で 15 分おきに 6 回洗浄し、AP (-) buffer [100 mM Tris-HCl (pH9.5)、100 mM NaCl、0.1% tween20] で 15 分洗浄し、AP (+) buffer (100 mM Tris-HCl (pH9.5) (Nacalai tesque)、50 mM MgCl₂ (Nacalai tesque)、100 mM NaCl (Nacalai tesque)、0.1% tween20 1 ml) 10 分ずつ 2 回洗浄した。その後、Staining solution [NBT (Roche) 4.5 μL、BCIP (Roche) 3.5 μL in 10%ポリビニルアルコール / AP (+) buffer] に置換し、遮光しながらシグナルが得られるまで反応させた。発色が完了したところで、PBT で 2 回洗浄をして、Staining solution を取り除き、5 mM EDTA (SIGMA) in PBS 溶液に置換し、反応を止めた。

gRNA の作製

決定した rab33a、rab33ba、rab33bb の cDNA 配列を基に、CRISPRdirect を用いて標的の候補を検索した。その中から、特異性が高く、なるべく遺伝子の上流にあるものを選別し、CRISPR の標的とした (表 3) 。pT7-gRNA にクローニングするため、標的配列から、3'側の最後の 3 塩基が PAM 配列 (NGG) になるように 20 塩基切り取り、その配列から PAM 配列を除去して、更に 5'側に TAGG を付加した配列を、センスオリゴ DNA として設計した。また、標的配列の 3'側の最後の 3 塩基が PAM 配列 (NGG) になるように 20 塩基切り取り、PAM 配列を除去した配列の相補的な配列の 5'側に AAAC を付加した配列を、アンチセンスオリゴ DNA として設計した。次に、100 μM の DNA (センスオリゴ) と 100 μM の DNA (アンチセンスオリゴ) を等量ずつ混ぜ、95°C、5 分間で反応させ変性させた後、95°Cから 10°C毎に温度を下げ、各温度で 30 秒間維持しながら、4°Cまで温度をゆっくり下げてアニーリングを行った。そのようにして、標的配列の 2 本鎖 DNA 10 μL 得た。pT7-gRNA プラスミド 8 μL に BsmBI (NEB) 1 μL と NEB3.1 バッファー 1 μL を加えて 55°Cで 1 時間反応させた後、80°Cで 20 分間反応させて、酵素を失活させた。得られた標的配列の 2 本鎖 DNA 6 μL、BsmBI で切断された pT7-gRNA 2 μL (100 ng)、T4 DNA ligase 1 μL、10× T4 ligase buffer 1 μL を加え、全量 10 μL でライゲーションを行った。ライゲーション後、大腸菌 NEB5α に形質転換を行い、アンピシリン入りの培地に撒いて、37°Cで一晩培養した。翌日、得られたシングルコロニーを取り、液体培地で 37°C、一晩振盪して培養し、さらに翌日得られた培養液から、DNA を抽出した。プラスミド pT7-rab33a、pT7-

rab33ba、pT7- rab33bb 8 μ L、BamHI 1 μ L、10 \times K buffer 1 μ L を加えて、10 μ L の系で 37 $^{\circ}$ C、1 時間反応させた後、線状化したプラスミド 1 μ g に T7 RNA polymerase 2 μ L (NEB)、RNase inhibitor 0.5 μ L、10 \times buffer 2 μ L、25 mM rNTP 2 μ L、100 mM DTT 1 μ L、滅菌水を加えて 20 μ L の系で、37 $^{\circ}$ C、3 時間反応させた。その後、反応液を RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて精製し、gRNA を得た。pCS2-nls-zCas9-nls (nCas9n) プラスミドに NotI を加えて、37 $^{\circ}$ C、2 時間反応させて直鎖化した。その後、mMACHINE SP6 kit (AMBION) を用いて、製品プロトコールに従って、nCas9n mRNA の *in vitro* 合成を行った。その後、反応液を RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて精製し、nCas9n mRNA を得た。

レスキュー用 mRNA の合成

プラスミド pCS2-rab33a、pCS2- rab33ba 各 10 μ g、それぞれ制限酵素 NotI 2 μ L、10 \times Buffer 2 μ L、全量 20 μ L の反応系で、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させて、直鎖化した。Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON GENETICS) を用いて、DNA を精製した。

in vitro で *rab33a* と *rab33ba* の mRNA の合成反応は、mMESSAGE mMACHINE[®] (Ambion) を用いて、直鎖化したプラスミド DNA 1 μ g、10X Reaction Buffer 2 μ l、2X NTP/CAP 10 μ l、Enzyme Mix 2 μ l を全量 20 μ l の反応系で、37 $^{\circ}$ C、2 時間で mRNA 合成、Cap 処理を行なった。DNase 処理を行なった後、サンプルの一部を電気泳動し mRNA の合成が行われていることを確認した。残りのサンプルを RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて精製し、-30 $^{\circ}$ C で保存した。

インジェクション

変異体を作製するためのインジェクション液は、300 ng/ μ L nCas9n mRNA 2.5 μ L、125 ng / μ L gRNA 1.0 μ L、KCl 1.0 μ L、0.5% phenol red 1 μ L に滅菌水を加えて、10 μ L になるように調製した。レスキュー実験を行うためのインジェクション液は、25 ng/ μ L *rab33a* mRNA、25 ng/ μ L *rab33ba* mRNA、KCl 1.0 μ L、0.5% phenol red 1 μ L に滅菌水を加えて、10 μ L になるように調製した。針は NRISHIGE ガラス管 (G-1) 1 \times 90 mm を Puller (PC-30、NARISHIGE) で加熱、牽引し、先端を細くし、その先端をピンセットで切断したものを用いた。微量注入器は、FemtoJet (Eppendorf) を使用し、一回の微量注入で 1 nl の溶液が出るように調節した。

変異体の作製

かけ合わせによる *rab33* 変異体の作製の概要は、図 1 に示した。まず、gRNA と Cas9 mRNA を微量注入した胚を成魚まで育て、野生型とかけ合わせた。得られた卵からゲノムを抽出し、遺伝型解析を行い、生殖細胞系統に変異が入った魚 (ファウンダー) を同定した。ファウンダーと野生型を再びかけ合わせて次世代

(F1) を得た。F1 が成魚になるまで育てた後、尻尾からゲノムを抽出した。このゲノムを用いて、遺伝型解析を行い、ヘテロ接合体の魚 (F2) を同定した。

ゲノムの抽出

ゲノムは受精卵および成魚の尻尾から抽出した。受精卵に Extraction buffer [10 mM tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA、200 ng/μL Proteinase K (Roche)] を 50 μL を入れて、68°C で 4 時間以上緩やかに振盪し、ゲノムを抽出した。成魚からのゲノム DNA の抽出に関しては、尻尾を先端から 1 mm 程度カミソリで切り取り、Extraction buffer を 50 μL 入れて、68°C で 4 時間以上緩やかに振盪し、ゲノムを抽出した

T7 endonuclease I (T7EI) アッセイ

T7EI は二本鎖 DNA のミスマッチを切断する酵素である。胚から抽出したゲノム 2 μL および尻尾先端から抽出したゲノム 1 μL、10x PCR Buffer (Mg²⁺ free) 1 μL、2.5 mM dNTP、25 mM MgCl₂、0.05 μL rTaq (TAKARA)、プライマー-rab33a-5' と rab33a-3'、rab33ba-5' と rab33ba-3'、rab33bb-5' と rab33bb-3' (参照表 3) を加え、全量 10 μL で PCR を行った。反応条件は二本鎖 DNA の熱変性を 98°C で 10 秒、アニーリングは表 4 を参照し、DNA 伸長を 72°C で 30 秒行い、サイクル数は 40 回とした。PCR 産物を融解、再アニーリングしたものを 4 μL、T7 endonuclease I (NEB) 0.125 μL、10× NEB buffer 1 μL を、10 μL の系になるように滅菌水を加えて、37°C で 30 分反応させた。反応させた PCR 産物を 2.5% アガロースゲルで電気泳動した。

免疫染色

受精後 36 時間胚の卵膜を除去し、4% (w / v) paraformaldehyde (PFA、Nacalai tesque) / PBS に回収し、4°C、O/N で固定処理を行なった。その後、PBT [PBS、0.1% Tween20 (Nacalai tesque)] で 4 回洗浄した後、50% (v / v) メタノール (Nacalai tesque) / PBT および 100% メタノールに段階置換を行ない、-30°C で保存した。メタノール中に保存している胚を 50% メタノール / PBT に段階置換し、PBTx [PBS、0.5% Triton-x (Nacalai tesque)] で 4 回洗浄、再水和した。-30°C のアセトン (Nacalai tesque) を加え、-30°C で 8 分処理して抗体の浸透性を高めた。PBTx で 4 回洗浄を行い、アセトンを除去した。Blocking buffer [4% Serum Goat Normal (VEC)、0.1% BSA in 0.5% PBTx] を加え、室温に 2 時間以上置いた。その後、1 / 1000 抗 acetylated tubulin 抗体 (Sigma) in Blocking buffer の抗体液に置換し、4°C で一晩反応させた。抗体液を除き、PBTx で 15 分おきに 6 回洗浄した。Blocking buffer を加え、室温に 1 時間以上置いた。その後、1 / 500 Alexa Fluor 488-

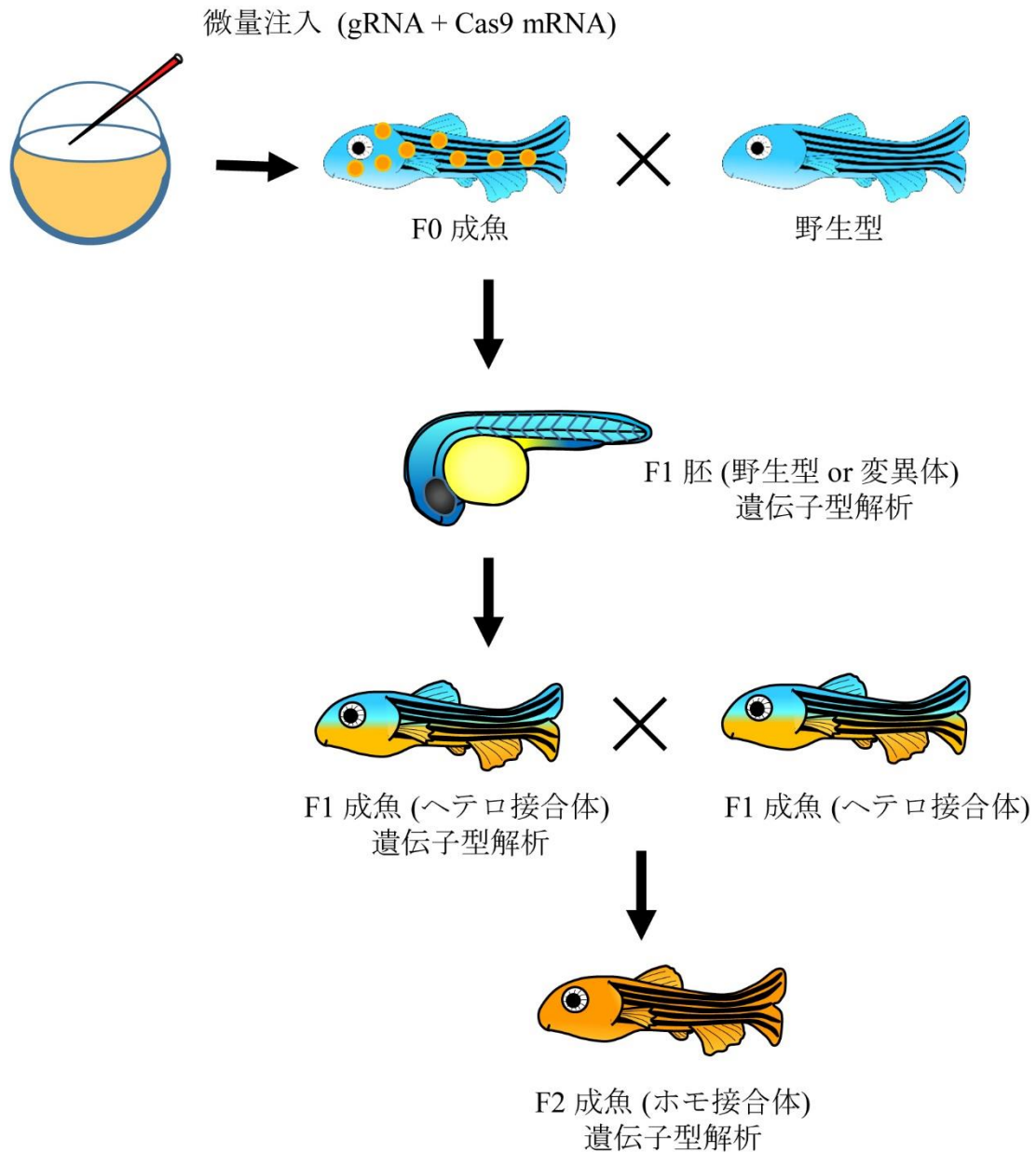


図1. CRISPR/Cas9システムを用いた変異体の作製

gRNAとCas9 mRNAを受精卵に微量注入した。微量注入した魚を成魚にまで育て、野生型と掛け合わせ、次世代 (F1) の胚を回収した。そして、F1胚からDNAを抽出し、T7EIアッセイを行い、変異を持つ胚がいるかをスクリーニングした。変異体を生む魚 (ファウンダー) を再び野生型と掛け合わせ、得られた胚 (F1) を成にまで育てた。F1の成魚の尾からDNAを抽出し、T7EIアッセイで変異を持つ魚を同定し、変異の塩基配列を決定した。その後、変異を持つF1同士をかけ合わせて、ホモ接合体 (F2) を作製した。

conjugated anti-mouse IgG (Molecular Probes) in Blocking buffer の二次抗体液に置換し、4°Cで一晩反応させた。翌日、抗体液を除き、PBTx で 15 分おきに 12 回洗淨して、PBS 溶液に置換した。

単一細胞標識

単一細胞標識実験を行うためのインジェクション液は、プラスミド 5 ng/ μ L emx3:Gal4FF、5 ng/ μ L UAS:tdTomato、KCl 1.0 μ L、0.5% phenol red 1 μ L に滅菌水を加えて、10 μ L になるように調製した。1 細胞期胚の細胞質に 1 nL インジェクション液を注射した。受精後約 24 時間に、注射を行われた胚の前脳を実体顕微鏡 (Leica MZFL III) で観察し、1 細胞だけが標記されそうの胚を収集した。受精後 36 時間に注射を行われた胚を 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA、Nacalai tesque) /PBS に回収し、4°Cで一晩固定処理を行なった。その後、抗 acetylated tubulin 抗体を用いた免疫染色を行った。

イメージング

ゼブラフィッシュを 1%の低融点アガロースゲル (invitrogen) に埋め込み、共焦点顕微鏡 (ZEISS LSM710 あるいは LSM700) を用いて観察した。撮影した画像から、Imaris を用いて、3D モデルを構築し、前脳軸索束の断面図を得た。得られた前脳軸索束の断面の面積を ImageJ で解析した。

結果

ゼブラフィッシュにおける *rab33* の同定

Rab33a は GTP 結合タンパク質 S10 として、初めてヒトから同定された (Koda and Kakinuma, 1993)。ゼブラフィッシュでは、受精後 72 時間胚における *rab33a* の cDNA 配列が登録されている (GenBank: BC122389.1)。*rab33a* の発現を確認し、コーディング領域全長をクローニングするために、受精後 48 時間胚を用いて RT-PCR を行い、クローニングした cDNA の配列の決定を行った。cDNA には 236 アミノ酸の Rab33a がコードされていた。ゼブラフィッシュの Rab33a のアミノ酸配列をヒトやマウスの Rab33a とアラインメントしたところ、相同性が見られた (図 2 星印)。

rab33a の相同性遺伝子である *rab33b* がヒト、ラット、マウスにおいて、存在することが報告されている (Zheng *et al.*, 1998)。ゼブラフィッシュでは、受精後 2 時間から 8 時間までの胚から得られた cDNA 配列が登録されている (GenBank: BC100131.1)。*rab33b* の発現を確認し、コーディング領域全長をクローニングするために、受精後 48 時間胚を用いて RT-PCR を行い、cDNA 配列の決定を行った。cDNA には 239 アミノ酸の Rab33b がコードされていた。ゼブラフィッシュの Rab33b のアミノ酸配列をヒトやマウスの Rab33b とアラインメントしたところ、相同性が見られた (図 3 星印)。

ヒト、ラット、マウスでは、1 つの Rab33B しか報告されていないが、ゼブラフィッシュにおいては、Rab33b に加えて、成魚から得られた *rab33ba* とは異なる cDNA (*rab33bb*) 配列が登録されている (GenBank: CF998775.1)。しかしながら、データベース上の DNA 配列に基づいて予測されるアミノ酸配列では、C 末端システインモチーフが欠けていた (図 4A)。一般に、Rab タンパク質には、GTP 結合に重要な G ドメインと膜の局在に必要な脂質修飾を受ける C 末端システインモチーフが存在する。実際にそのような発現がみられるかを確かめるために、受精後 48 時間胚を用いて RT-PCR を行い、cDNA 配列の決定を行った。cDNA には 227 アミノ酸の Rab33a がコードされていた。データベース上の配列と比べて、1 塩基 (A) の挿入が見られた (図 4A, B)。この塩基配列に基づいて、ゼブラフィッシュの Rab33bb タンパク質のアミノ酸配列を予測したところ、C 末端システインモチーフが見られた (図 4B 下線)。そして、最近、私がクローニングをした *rab33bb* アミノ酸と同じの配列が報告された (Hall *et al.*, 2017)。

ゼブラフィッシュ Rab33a はヒト RAB33A と 74.9%、ヒト RAB33B と 53.8% の同一性 (identity) がある。ゼブラフィッシュ Rab33ba はヒト RAB33A と 53.4%、ヒト RAB33B と 66.3% の同一性がみられた。一方、ゼブラフィッシュ Rab33bb

はヒト RAB33A と 48.1%、ヒト RAB33B と 47.3%の同一性がみられた (図 5A, B)。

ゼブラフィッシュ *rab33a* と *rab33ba* はそれぞれ哺乳類 *Rab33a* と *Rab33b* のオーソログである

ゼブラフィッシュ *rab33a*、*rab33ba*、*rab33bb* はそれぞれ 236、239、227 アミノ酸 (aa) のタンパク質をコードする (図 2、3、4)。*rab33* 遺伝子が脊椎動物において、保存されているかを調べるために、*Rab33a*、*Rab33ba*、*Rab33bb* のアミノ酸配列を用いて、Ensembl のデータベースに対して、相同性検索を行い、ヒト、ラット、マウス、イヌ、ニワトリ、メダカ、フグに存在する相同性遺伝子のアミノ酸配列を得た。得られたアミノ酸配列の全長を用いて、マルチプルアライメントを行い、系統樹を作成した (図 6A)。また、系統樹解析により、ゼブラフィッシュの 3 つの *Rab33* は異なるグループに分かれることが明らかになった (図 6)。ゼブラフィッシュ *Rab33a* と哺乳類 *Rab33a*、ゼブラフィッシュ *Rab33ba* と哺乳類 *Rab33b* はそれぞれ同じグループに属していた。一方、ゼブラフィッシュ *Rab33bb* は、ゼブラフィッシュ以外ほかの魚類からは見出されておらず、哺乳類の *Rab33a* や *Rab33b* とは異なるグループに属することが分かった (図 6A)。*rab33ba* および *rab33bb* の周辺の遺伝子の並び (シンテニー) を調べたところ、ヒトの *RAB33B* およびマウスの *Rab33b* の周辺の遺伝子の並びは、ゼブラフィッシュの *rab33ba* の周辺の遺伝子の並びとよく似ており、ゼブラフィッシュの *rab33bb* の周辺の遺伝子の並びとは異なることが分かった (図 6B)。以上の結果から、ゼブラフィッシュ *rab33a* はヒト *RAB33A*、ゼブラフィッシュの *rab33ba* はヒト *RAB33B* のオーソログ遺伝子であることが示唆された。

ゼブラフィッシュにおける *rab33* の発現解析

ゼブラフィッシュにおいて、*rab33a*、*rab33ba*、*rab33bb* が発生の中のどの段階から発現しているかを明らかにするために、ゼブラフィッシュの受精後 0 時間 (一細胞期)、24 時間、36 時間、48 時間の胚を用いて RT-PCR を行った。受精後 0 時間、24 時間、36 時間、48 時間の胚において、*rab33a*、*rab33ba*、*rab33bb* の PCR 産物が検出された (図 7A、B)。この結果は、*rab33a*、*rab33ba*、*rab33bb* はゼブラフィッシュの発生初期段階から発現していることを示唆している。

次に、ゼブラフィッシュ発生過程において *rab33a* がどこで発現しているかを調べるために、受精後 0 時間、受精後 24 時間、36 時間の胚を用いて whole mount *in situ* hybridization を行なった (図 8)。受精後 0 時間の受精卵において、細胞質で *rab33a* の発現が検出された (図 8A、B)。受精後 24 と 36 時間胚において、前脳と後脳で *rab33a* の発現が検出された (図 8C-F)。コントロールとして sense プローブを用いた *in situ* hybridization を行った胚では、発現が見られなかった (図 8E-F)。そして、前脳の拡大図では、*rab33a* は終脳の DorsoRostral Cluster (DRC) の神経細胞と間脳の VentroRostral Cluster (VRC) の神経細胞で発現するこ


```

zRab33a      1:MANEFSENRDGTANSRHLNLTSSLDLSTSLDHSVQTRIFKIIIVIGDSNVGKTCLTFRFTG 60
hRAB33A     1:--MAQPILGHGSLQPASAAGLASLELDSSLDQYVQIRIFKIIIVIGDSNVGKTCLTFRFCG 58
mRab33A     1:--MAQPILGHGSLQPASAAGLASLELDSSMDQYVQIRIFKIIIVIGDSNVGKTCLTFRFCG 58
              *           *           ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
zRab33a     61:GAFPCKTEATIGVDFREKAVEIEGEKIKVQVWDTAGQERFRKSMVEHYRNVHAVVVFVYD 120
hRAB33A     59:GTFPDKTEATIGVDFREKTVEIEGEKIKVQVWDTAGQERFRKSMVEHYRNVHAVVVFVYD 118
mRab33A     59:GTFPDKTEATIGVDFREKTVEIEGEKIKVQVWDTAGQERFRKSMVEHYRNVHAVVVFVYD 118
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
zRab33a    121:VTKMASFQNLKTIWIEQCNHGVSSAVPRVLVGNKCDLVDQIQVPSNTALKFADAYNMLLF 180
hRAB33A    119:VTKMTSFTNLKMWIEQCNHGVPPPLVPKVLVGNKCDLREQIQVPSNLALKFADAHNMLLF 178
mRab33A    119:VTKMTSFTNLKMWIEQCNHGVPPPLVPKVLVGNKCDLREQIQVPSNLALKFADAHNMLLF 178
              ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
zRab33a    181:ETSAKDPKESQNVDSIFMCLACRLKAQKSLIYRDVEREDGRV-RLT--HQDPKSNCP 236
hRAB33A    179:ETSAKDPKESQNVESIFMCLACRLKAQKSLLYRDAERQOGKVQKLEFPQEANSKTS 237
mRab33A    179:ETSAKDPKESQNVESIFMCLACRLKAQKSLLYRDAERQOGKVQKLEFSQEANGKASC 237
              ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

図2. Rab33a のマルチプルアラインメント

本研究でクローニングしたcDNAがコードするゼブラフィッシュRab33aのアミノ酸配列をヒトRAB33A (ENST00000257017.4)、マウスRab33a (ENSMUST00000033430.2)とアラインメントした。z: zebrafish; h: human; m: mouse。星印：ゼブラフィッシュ、ヒト、マウスの相同のアミノ酸配列。

```

zRab33ba    1:-----MADIESSFEFSSSLTSSS--LPPPRTRIFKIIIVIGDSGVGKTCLTYRFCAGKFPD 53
hRAB33B     1:MAEEMESSLEASFSSSGAVSGASGFLPPARSRIFKIIIVIGDSNVGKTCLTYRFCAGRFPD 60
mRab33B     1:MTSEMESSLEVSFSSSCAVSGASGCLPPARSRIFKIIIVIGDSNVGKTCLTYRFCAGRFPD 60
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
zRab33ba    54:KTEATIGVDFREKVIEIDGEKIKVQLWDTAGQERFRKSMVQHYYRNVHAVVVFVYDVTNAA 113
hRAB33B     61:RTEATIGVDFRERAVEIDGERIKIQLWDTAGQERFRKSMVQHYYRNVHAVVVFVYDMTNMA 120
mRab33B     61:RTEATIGVDFRERAVDIDGERIKIQLWDTAGQERFRKSMVQHYYRNVHAVVVFVYDMTNMA 120
              ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
zRab33ba    114:SFRSLPAWIEEQRQHALLGQEVPRILVGNKCDLRHAAQVSTDVAQQFADTHSMPLFETSAK 173
hRAB33B     121:SFHSLPSWIEECKQHLLANDIPRILVGNKCDLRSIQVPTDLAQKFADTHSMPLFETSAK 180
mRab33B     121:SFHSLPAWIEECKQHLLANDIPRILVGNKCDLRSIQVPTDLAQKFADTHSMPLFETSAK 180
              ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
zRab33ba    174:NPYGNEDGTQNNSDHVEAIFMTVAHKLKLSQKPLVLSQPPCGYGDVTLLRQDQEDGGNWG 233
hRAB33B     181:NP-----NDNDHVEAIFMTLAHKLKSHKPLMLSQPP---DNGIILKPEPKPAMTCWC 229
mRab33B     181:NP-----NDNDHVEAIFMTLAHKLKSHKPLMLSQLP---DNRISLKPETKPAVTCWC 229
              ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
zRab33ba    234:CGCWRS 239
hRAB33B     229:----- 229
mRab33B     229:----- 229

```

図3. Rab33bのマルチプルアラインメント

本研究でクローニングしたcDNAがコードするゼブラフィッシュRab33baのアミノ酸配列をヒトRAB33A (ENST00000305626.5)、マウスRab33a (ENSMUST00000054387.7)とアラインメントした。z: zebrafish; h: human; m: mouse。星印：ゼブラフィッシュ、ヒト、マウスの相同のアミノ酸配列。

A

```

ATGGATTTCGCTTTAGAAAAGCTCCAGCTCCTCTAACGGCCCCCGACGCGCTGCTGTCCG
1  M D S S L E S S S S S N G P P T R C C R      20
ACCTGTAAGATCATCGTGATCGGGGATGCCGGTGTGGCAAGACCTGTCTGACACATCGA
21  T C K I I V I G D A G V G K T C L T H R      40
TTCTGCACCGGACAATTTCCCTACCAGAACAGAGGCGACCATCGGGGTGGATTTTCGAGAG
41  F C T G Q F P T R T E A T I G V D F R E      60
AAACTTCTTCAGATAGACGGCGAAAAAATAAAAGTACAGCTATGGGACACGGCCGGTCAG
61  K L L Q I D G E K I K V Q L W D T A G Q      80
GAGCGCTTCCGTAAAAGCATGGTGCAGCACTACTATCGAAATGTGCATGGTATCGTCTTC
81  E R F R K S M V Q H Y Y R N V H G I V F     100
GTCTTTGACGTCACAAACCAATCCAGTTTCTGCAATCTGCCTTTGTGGATGGACGAGTGC
101 V F D V T N Q S S F C N L P L W M D E C     120
CGTCAGCACTCTCTTGGTCTGGAAATTCACGTGCCCTAGTTTGCAACAAGGCTGACCTG
121 R Q H S L G L E I P R A L V C N K A D L     140
ATGTCTTCAAATGCTTCTGTGCTAATCGAGCAGGCTCGTCATTTGGCTGAAGTCCACGGG
141 M S S N A S V L I E Q A R H L A E V H G     160
ATGTCTTTTTTATCTCACTTCAGCCAAAGGTCTTAAAGGCGACCAGGTGGACAGCATCTTC
161 M S F Y L T S A K G L K G D Q V D S I F     180
ATGGCTTTAGCACAGAGGCTGAAGAGCCAGAGAAGGGAGAGCGTAAATGGACGTGTGCTA
181 M A L A Q R L K S Q R R E S V N G R V L     200
GAGTGCAGAGCTGAGAGCTTAAAATCCAGGCACGGGTTATAA
201 E C R A E S L K S R H G L *           214

```

B

```

ATGGATTTCGCTTTAGAAAAGCTCCAGCTCCTCTAACGGCCCCCGACGCGCTGCTGTCCG
1  M D S S L E S S S S S N G P P T R C C R      20
ACCTGTAAGATCATCGTGATCGGGGATGCCGGTGTGGCAAGACCTGTCTGACACATCGA
21  T C K I I V I G D A G V G K T C L T H R      40
TTCTGCACCGGACAATTTCCCTACCAGAACAGAGGCGACCATCGGGGTGGATTTTCGAGAG
41  F C T G Q F P T R T E A T I G V D F R E      60
AAACTTCTTCAGATAGACGGCGAAAAAATAAAAGTACAGCTATGGGACACGGCCGGTCAG
61  K L L Q I D G E K I K V Q L W D T A G Q      80
GAGCGCTTCCGTAAAAGCATGGTGCAGCACTACTATCGAAATGTGCATGGTATCGTCTTC
81  E R F R K S M V Q H Y Y R N V H G I V F     100
GTCTTTGACGTCACAAACCAATCCAGTTTCTGCAATCTGCCTTTGTGGATGGACGAGTGC
101 V F D V T N Q S S F C N L P L W M D E C     120
CGTCAGCACTCTCTTGGTCTGGAAATTCACGTGCCCTAGTTTGCAACAAGGCTGACCTG
121 R Q H S L G L E I P R A L V C N K A D L     140
ATGTCTTCAAATGCTTCTGTGCTAATCGAGCAGGCTCGTCATTTGGCTGAAGTCCACGGG
141 M S S N A S V L I E Q A R H L A E V H G     160
ATGTCTTTTTTATCTCACTTCAGCCAAAGGTCTTAAAGGCGACCAGGTGGACAGCATCTTC
161 M S F Y L T S A K G L K G D Q V D S I F     180
ATGGCTTTAGCACAGAGGCTGAAGAGCCAGAGAAGGGAGAGCGTAAATGGACGTGTGCTA
181 M A L A Q R L K S Q R R E S V N G R V L     200
GAGTGCAGAGCTGAGAGCTTAAAAATCCAGGCACGGGTTATAACAGCCCAAGAGACTAAA
201 E C R A E S L K I Q A R V I T A Q E T K     220
AAGAAATGGACCTGCATCTGCTAA
221 K K W T C I C *           228

```

図4. *rab33bb* cDNA配列の決定

(A) データベース上に登録されている*rab33bb*のcDNA配列 (GenBank: CF998775.1) と予測されるアミノ酸配列。

(B) 受精後48時間胚から決定した*rab33bb*のcDNA配列と予測されるアミノ酸配列。赤字は1塩基の挿入を示す。下線はC末端システインモチーフの配列。

A

```

zRab33a      1:MANEFSENDRGTANSRHLNLTSSLDLSTSLDHSVQTRIFKIIIVIGDSNVGKTCLTFRFTG 60
zRab33ba     1:-----MADIESSFEFSSSLTSSS--LPPRTRIFKIIIVIGDSGVGKTCLTYRFCA 48
zRab33bb     1:-----MDSSESSSSSNGPPTRCRTCKIIVIGDAGVGKTCLTHRFTCT 43
hRAB33A      1:--MAQPILGHGSLQPASAAGLASLELDSSLDQYVQIRIFKIIIVIGDSNVGKTCLTFRFCG 58
hRAB33B      1:-----MAEEMESSLEASFSSSGAVSGASGFLPPARSRIKIIIVIGDSNVGKTCLTYRFCA 55
                                     *  * * * * * * * * * * * * * * * * *
zRab33a     61:GAFPCCKTEATIGVDFREKAVEIEGEKIKVQVWDTAGQERFRKSMVEHYRNVHAVVFVYD 120
zRab33ba     49:GKFPDKTEATIGVDFREKVEIDGEKIKVQLWDTAGQERFRKSMVQHYRNVHAVVFVYD 108
zRab33bb     44:GQFPTRTEATIGVDFREKLLQIDGEKIKVQLWDTAGQERFRKSMVQHYRNVHGVIVFVFD 103
hRAB33A      59:GTFPDKTEATIGVDFREKTVIEGEKIKVQVWDTAGQERFRKSMVEHYRNVHAVVFVYD 118
hRAB33B      56:GRFPDRTEATIGVDFRERAVEIDGERIKIQLWDTAGQERFRKSMVQHYRNVHAVVFVYD 115
                                     * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
zRab33a     121:VTKMASFQNLKWTWIEQCNHGVSSAVPRVLVGNKCDLVDQIQ-VPSNTALKFADAYNMLL 179
zRab33ba     109:VTNAASFRSLPAWIEECRQHALLGQEVPRILVGNKCDLRHAAQ-VSTDVAQQFADTHSMPL 167
zRab33bb     104:VTNQSSFCNLPLWMDECRQHSLGLEIPRALVCNKADLMSSNASVLIIEQARHLAEVHGMSF 163
hRAB33A      119:VTKMSTFTNLKMWIQECNHAVPPLVPKVLVGNKCDLREQIQ-VPSNLALKFADAHNMLL 177
hRAB33B      116:MTNMASFHSLPSWIEECKQHLLLANDIPRILVGNKCDLRSIQ-VPTDLAQKFADTHSMPL 174
                                     * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
zRab33a     180:FETSAKDP-----KESQNVDSIFMCLACRLKAQKSLIYRDVEREDGRV-RLT--HQP 228
zRab33ba     168:FETSAKNPYGNEDGTQNSDHVEAIFMTVAHKLKSQKPLVLSQPPCGYGDVTVLRQDQE 227
zRab33bb     164:YLTSAGL-----KGDQVDSIFMALAQRLKSQRRESVNGRVLECRAESLKIQARVI 214
hRAB33A      178:FETSAKDP-----KESQNVESIFMCLACRLKAQKSLLYRDAERQQGKVQKLEFPQEA 229
hRAB33B      175:FETSAKNP-----NDNDHVEAIFMTLAHKLKSHPKPLMLSQPP---DNGIILKPEPKP 223
                                     * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
zRab33a     229:DPKSNPCP----- 236
zRab33ba     228:DGGNWGCGCWRS- 239
zRab33bb     215:TAQETKKKWTCIC 227
hRAB33A      230:NSKTSCPC----- 237
hRAB33B      224:AMTCWC----- 229

```

B

	hRAB33A	hRAB33B	mRab33A	mRab33B	zRab33a	zRab33ba
hRAB33B	55.3%					
mRab33A	98.3%	55.3%				
mRab33B	53.6%	94.8%	53.2%			
zRab33a	74.9%	53.8%	74.5%	53.4%		
zRab33ba	53.4%	66.3%	53.9%	56.9%	51.4%	
zRab33bb	48.1%	47.3%	48.1%	47.8%	44.5%	51.8%

図5. Rab33bbのマルチプルアラインメント

(A) 本研究でクローニングしたcDNAがコードしていたゼブラフィッシュRab33bbのアミノ酸配列をヒトRAB33A、ヒトRab33B、ゼブラフィッシュRab33a、ゼブラフィッシュRab33baとアラインメントした。z: zebrafish; h: human; m: mouse

(B) ゼブラフィッシュRab33A、Rab33ba、ゼブラフィッシュRab33bbとヒトRAB33A、ヒトRab33B、マウスRab33A、マウスRab33Bの同一性。

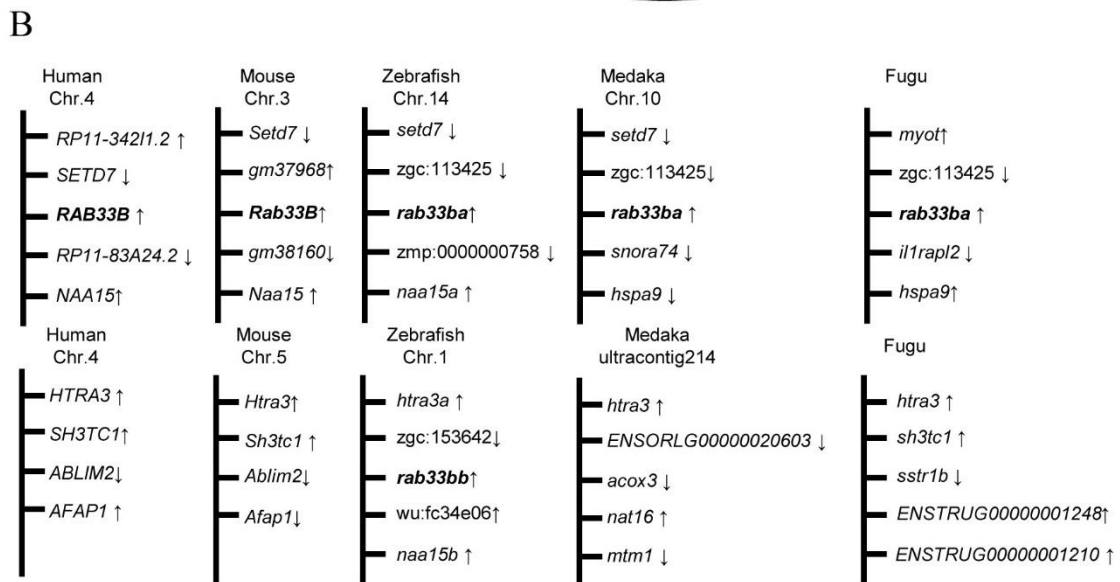
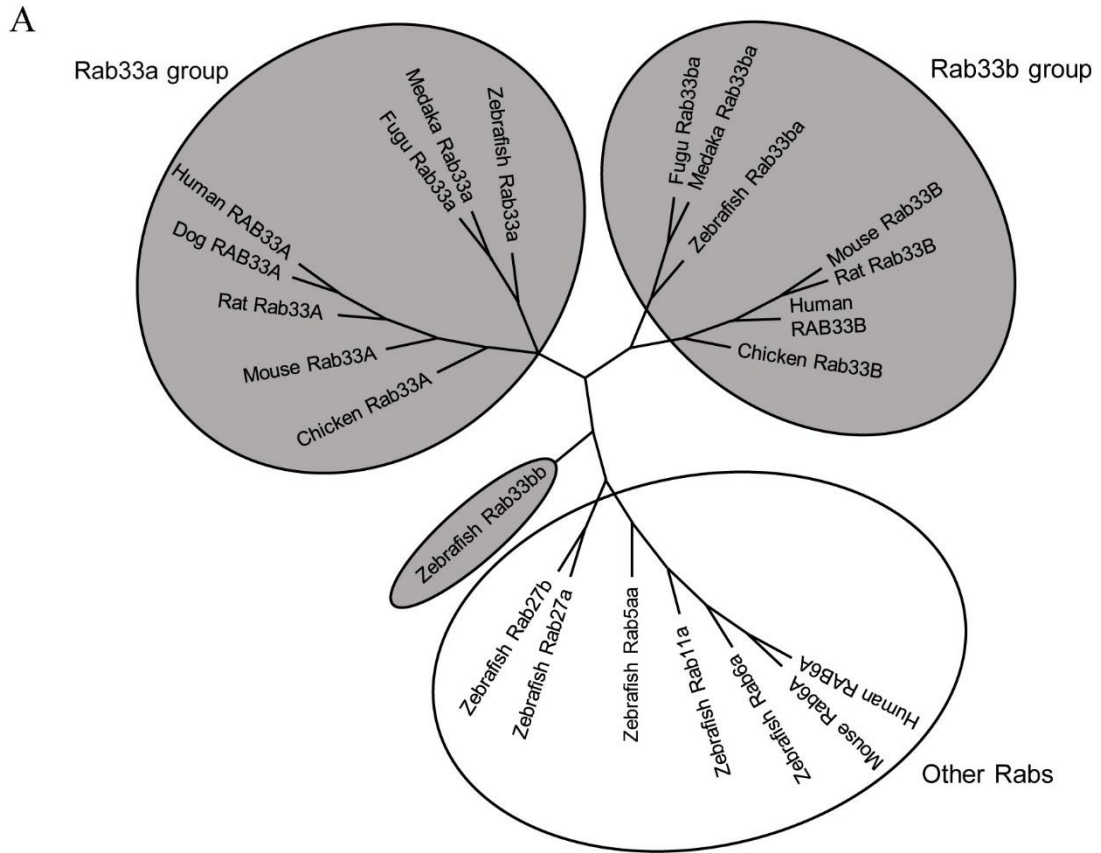


図6. Rab33の系統樹とシンテニー

(A) 脊椎動物Rab33および他のRabタンパク質の系統樹。系統発生解析に用いられたタンパク質配列の番号を表2に示す。

(B) ゼブラフィッシュ *rab33ba*、*rab33bb* とヒト、マウス、メダカ、フグのシンテニー。

とがわかった (図 8C', D')。DRC 神経細胞は Anterior Commissure (AC)、VRC 神経細胞は Postoptic Commissure (POC) にそれぞれ軸索を伸ばすことが知られている (Barresi, 2005; Chitnis and Kuwada, 1990; Wilson *et al.*, 1990)。

また、ゼブラフィッシュ発生過程において *rab33ba* がどこで発現しているかを調べるために、受精後 0 時間、受精後 24 時間、36 時間の胚を用いて *whole mount in situ hybridization* を行なった。受精後 0 時間の受精卵において、細胞質で *rab33ba* の染色が検出された (図 9A, B)。受精後 24 時間胚において、脳全体および尾で *rab33ba* の染色が見られた (図 9C)。受精後 36 時間胚においても、脳の全体に *rab33ba* の染色が検出された (図 9D)。コントロールとして *sense* プロブを用いた *in situ hybridization* を行った胚では、発現が見られなかった (図 9E-F)。受精後 24 時間胚の前脳の拡大図では、*rab33ba* も終脳の DRC と VRC の神経細胞で発現することがわかった (図 9C', D')。

***rab33a* と *rab33ba* の変異体の作製**

rab33a の生体内での機能を明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムを用いて、*rab33a* の変異体を作製した。*rab33a* の変異体を作製するために、*rab33a* の exon1 を標的とした gRNA (図 10A) と Cas9 mRNA を受精卵に微量注入した。微量注入した魚を成魚にまで育て、野生型と掛け合わせ、胚を成魚まで育て、T7EI アッセイにより変異を持つ魚を同定した。変異を持つ魚の *rab33a* の塩基配列を確認したところ、CRISPR の標的領域に 10 塩基の欠失が見られた (図 10B)。このフレームシフト変異では、*rab33a* の前半に STOP コドンが生じ、正常な 13 アミノ酸に 7 アミノ酸が付加されたタンパク質が作られる (図 10C)。この変異体を用いて表現型解析を行うことにした。*rab33a* のホモ接合体とヘテロ接合体は、T7EI を用いた遺伝子型解析により同定した (図 10D)。

ゼブラフィッシュにおいて、*rab33a* と *rab33ba* は同じ染色体 (14 番染色体) に存在することが分かっている。*rab33ba*^{-/-}変異体作製には、*rab33ba* の exon1 を標的とした gRNA (図 11A) と Cas9 mRNA を *rab33ba*^{-/-}変異体の受精卵に微量注入した。微量注入した魚を成魚にまで育て、野生型と掛け合わせ、胚を成魚まで育て、T7EI アッセイにより変異を持つ魚を同定した。変異を持つ魚の *rab33ba* の塩基配列を確認したところ、CRISPR の標的領域に 2 塩基の欠失 (5 塩基の欠失と 3 塩基の挿入) が見られた (図 11B)。このフレームシフト変異では、*rab33ba* の前半に STOP コドンが生じ、正常な 59 アミノ酸に 8 アミノ酸が付加されるタンパク質が作られる (図 11C)。*rab33ba* のホモ接合体とヘテロ接合体は、T7EI を用いた遺伝子型解析により同定した (図 11D)。

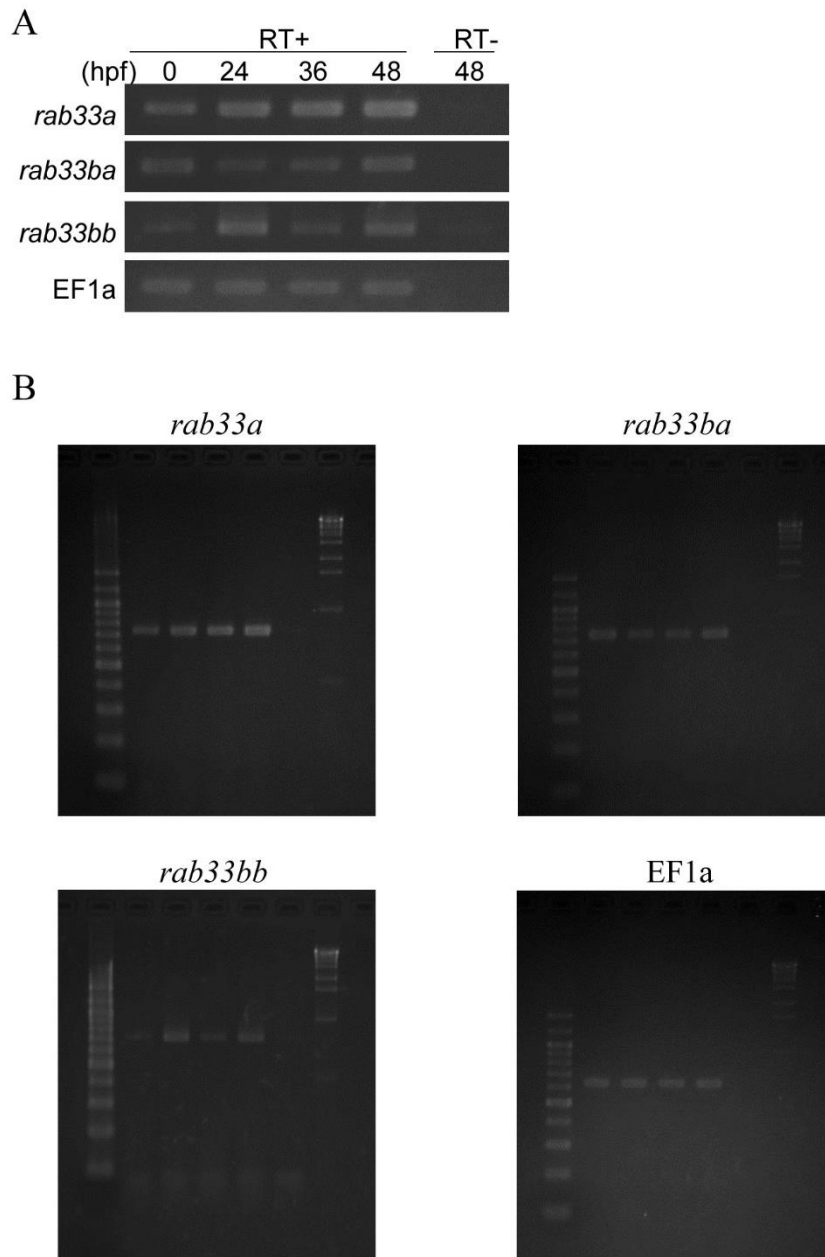


図7. ゼブラフィッシュの初期発生胚における*rab33*の発現

(A) *rab33a*、*rab33ba*および*rab33bb*転写物のRT-PCR解析。受精後0時間、24時間、36時間、48時間胚のmRNAを用いて、RT-PCRを行い、その反応産物を2%アガロースゲルで電気泳動した。

(B) アガロースゲルの全長の写真。

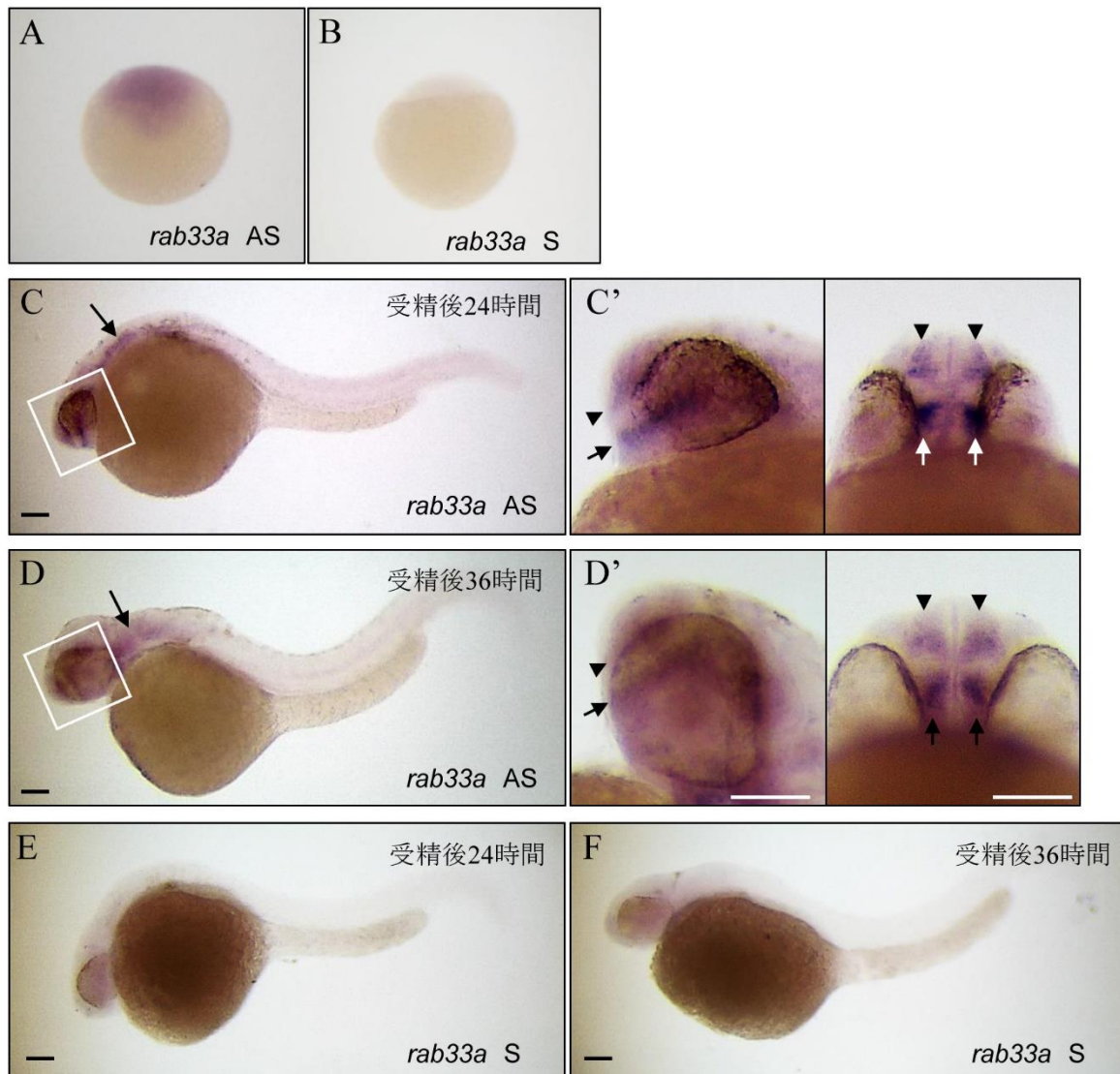


図8. ゼブラフィッシュの初期発生胚における*rab33a*の発現

(A、B) 受精後0時間胚での*rab33a*のwhole mount *in situ* hybridization。ASはアンチセンスプローブ、Sはセンスプローブを示す。

(C、E) 受精後24時間胚での*rab33a*のwhole mount *in situ* hybridization。(C')は、長方形によって示される領域の拡大横(左)とび腹(右)の図を示す。

(D、F) 受精後36時間胚での*rab33a*のwhole mount *in situ* hybridization。(D')は、長方形によって示される領域の拡大横(左)とび腹(右)の図を示す。

(C-D)の矢印は後脳を示す。(C'、D')の矢印と矢印は、それぞれDRCとVRCを示す。

scale bar : 100 μ m。

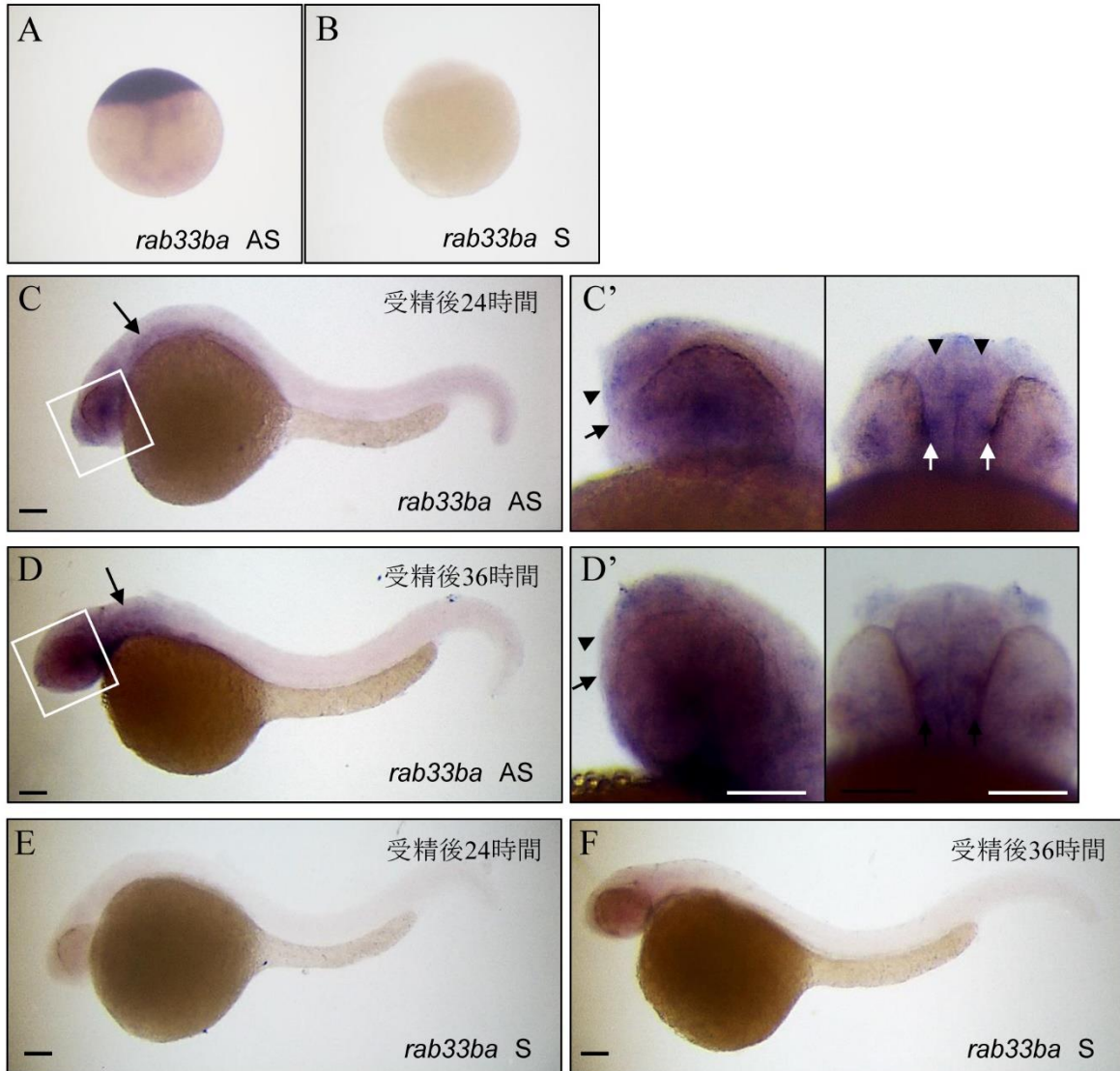


図9. ゼブラフィッシュの初期発生胚における*rab33ba*の発現

(A, B) 受精後0時間胚での*rab33ba*のwhole mount *in situ* hybridization。ASはアンチセンスプローブ、Sはセンスプローブを示す。

(C, E) 受精後24時間胚での*rab33ba*のwhole mount *in situ* hybridization。 (C') は、長方形によって示される領域の拡大横 (左) とび腹 (右) の図を示す。

(D, F) 受精後36時間胚での*rab33ba*のwhole mount *in situ* hybridization。 (D') は、長方形によって示される領域の拡大横 (左) とび腹 (右) の図を示す。

(C-D) の矢印は後脳を示す。(C', D') の矢印と矢印は、それぞれDRCとVRCを示す。

scale bar : 100 μ m。

***rab33a* と *rab33ba* は AC の形成に関与する**

in situ hybridization の結果から、*rab33a* と *rab33ba* は前脳の DRC と VRC で発現することがわかった。先行研究から、DRC にある神経細胞が軸索を伸長し、AC を形成して、終脳の左右半球を繋いでいることがわかっている。また、VRC にある神経細胞が軸索を伸長し、POC を形成し、間脳の左右半球を繋いでいることがわかっている (Chitnis *et al.*, 1990; Ross *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2012)。そこで、脳形成における *rab33* の機能を明らかにするために、AC と POC の形態を解析した。

ゼブラフィッシュの脳内神経軸索の形態形成を可視化するために、野生型と変異体胚には、神経軸索マーカーである抗アセチル化チューブリン抗体 (Chitnis and Kuwada, 1990) を用いたホールマウント免疫染色を行った。それらの胚を共焦点顕微鏡で撮影し、得られた画像を 3D で構築し、AC と POC の形態を観察した (図 12A)。

AC の形態形成を解析するために、AC の正中線における断面積の大きさを測った (図 12B-F)。その結果、野生型胚の断面積は $189.4 \pm 10.1 \mu\text{m}^2$ (図 12B, n=17) である。*rab33a*^{-/-}変異体の断面積は $178.7 \pm 12.3 \mu\text{m}^2$ (図 12C, n=18)、*rab33ba*^{-/-}変異体の断面積は $184.4 \pm 10.9 \mu\text{m}^2$ (図 12D, n=18) であり、野生型と比べて、有意な差が見られなかった (図 12G)。一方、*rab33a*^{-/-};*rab33ba*^{-/-}二重変異体胚の断面積は $102.7 \pm 16.2 \mu\text{m}^2$ (図 12E, n=17) であり、野生型と比べて、有意に減少していた (図 12G, P<0.01)。さらに、*rab33a* と *rab33ba* が二重変異体の表現型と関与しているか確かめるために、*rab33a* と *rab33ba* の二重変異体胚に *rab33a* と *rab33ba* の mRNA を微量注入した。その結果、*rab33a*^{-/-};*rab33ba*^{-/-}二重変異体に *rab33a* mRNA と *rab33ba* mRNA をインジェクションした胚の AC の断面積は $163.2 \pm 10.72 \mu\text{m}^2$ (図 12F, n=22) であり、二重変異体胚と比べて、AC の断面積の減少がレスキューされた (図 12G, P<0.01)。これらの結果は、*rab33a* と *rab33ba* が AC の形成に関与することが示唆された。

***rab33a* と *rab33ba* は POC の形成に関与する**

in situ hybridization の結果から、*rab33a* と *rab33ba* は前脳の POC を構成する VRC でも発現していることがわかった。そこで、POC の形成を解析するために、POC の正中線の断面積の大きさを測った。野生型胚の断面積は $164.8 \pm 12.4 \mu\text{m}^2$ (図 13A, n=11) である。*rab33a*^{-/-}変異体の断面積は $158.6 \pm 11.5 \mu\text{m}^2$ (図 13B, n=11)、*rab33ba*^{-/-}変異体の断面積は $170.1 \pm 9.4 \mu\text{m}^2$ (図 13C, n=14) であり、野生型と比べて、有意な差が見られなかった。一方、*rab33a*^{-/-};*rab33ba*^{-/-}二重変異体胚の断面積は $103.7 \pm 12.4 \mu\text{m}^2$ (図 13D, n=14) であり、野生型と比べて、有意に減少していた (図 13F, P<0.01)。この結果は、*rab33a* と *rab33ba* が POC の形成に

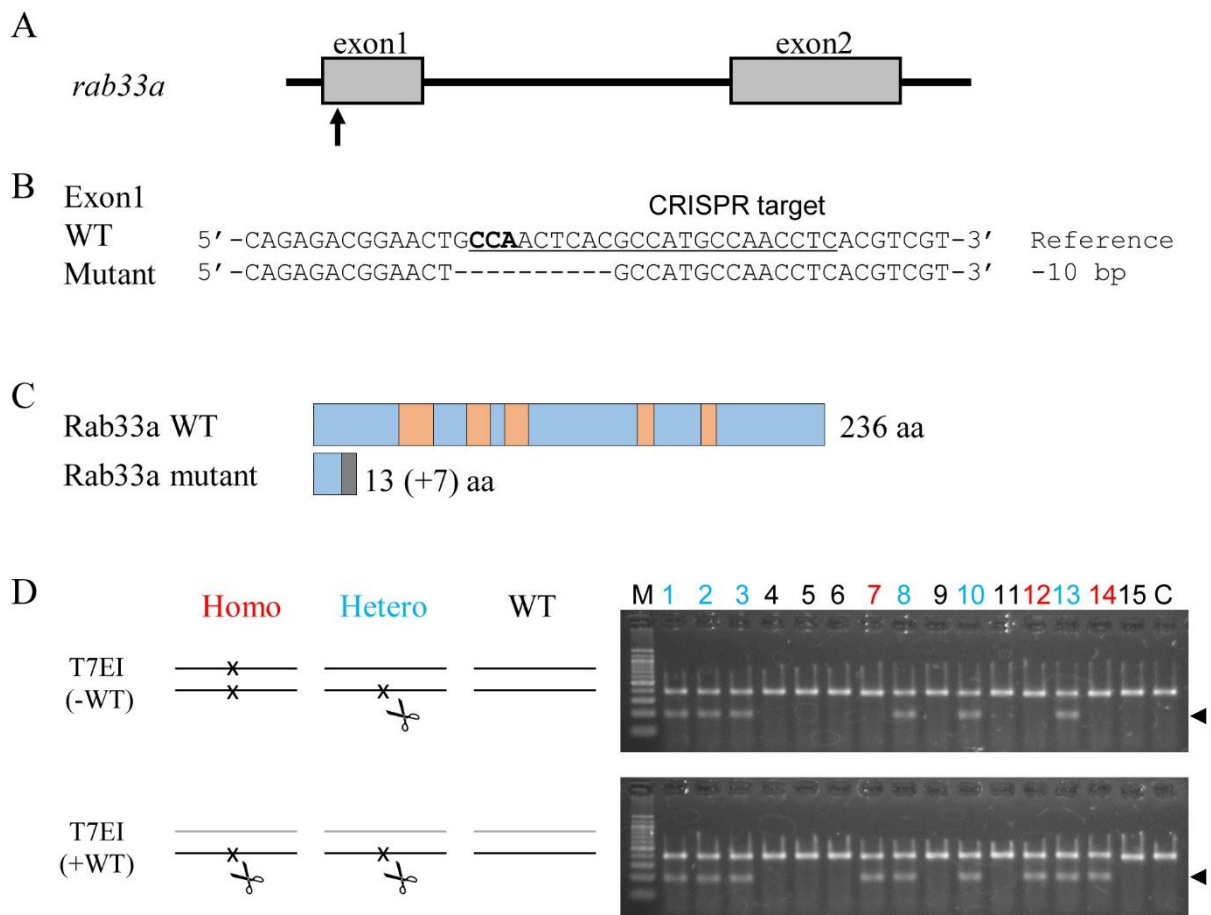


図10. CRISPR/Cas9システムを用いた*rab33a*変異体の作製

(A) CRISPR/Cas9システムの*rab33a*のターゲット。

(B) 野生型と変異体の*rab33a*の塩基配列。10塩基の欠失が見られた。

(C) 予想されるRab33a野生型と変異体のタンパク質構造。

(D) T7EIアッセイにより*rab33a*遺伝子型の決定。PCR反応は、*rab33a*特異的プライマーを用いて行った。PCR産物は、野生型PCR産物 (-WT) または野生型PCR産物 (+W) を用いずに変性および再アニーリングした。アニーリングされた二本鎖DNAをT7EIで処理し、2.5%アガロースゲル中で電気泳動により分析した。矢印はT7EI消化バンドを示す。異なる色のレーン番号は、ホモ接合体 (赤色)、ヘテロ接合体 (青色) および野生型 (黒色) の異なる遺伝的背景を示す。M : DNAマーカー; Cは、対照として野生型ゲノムDNA鋳型を用いて得られたPCR産物である。

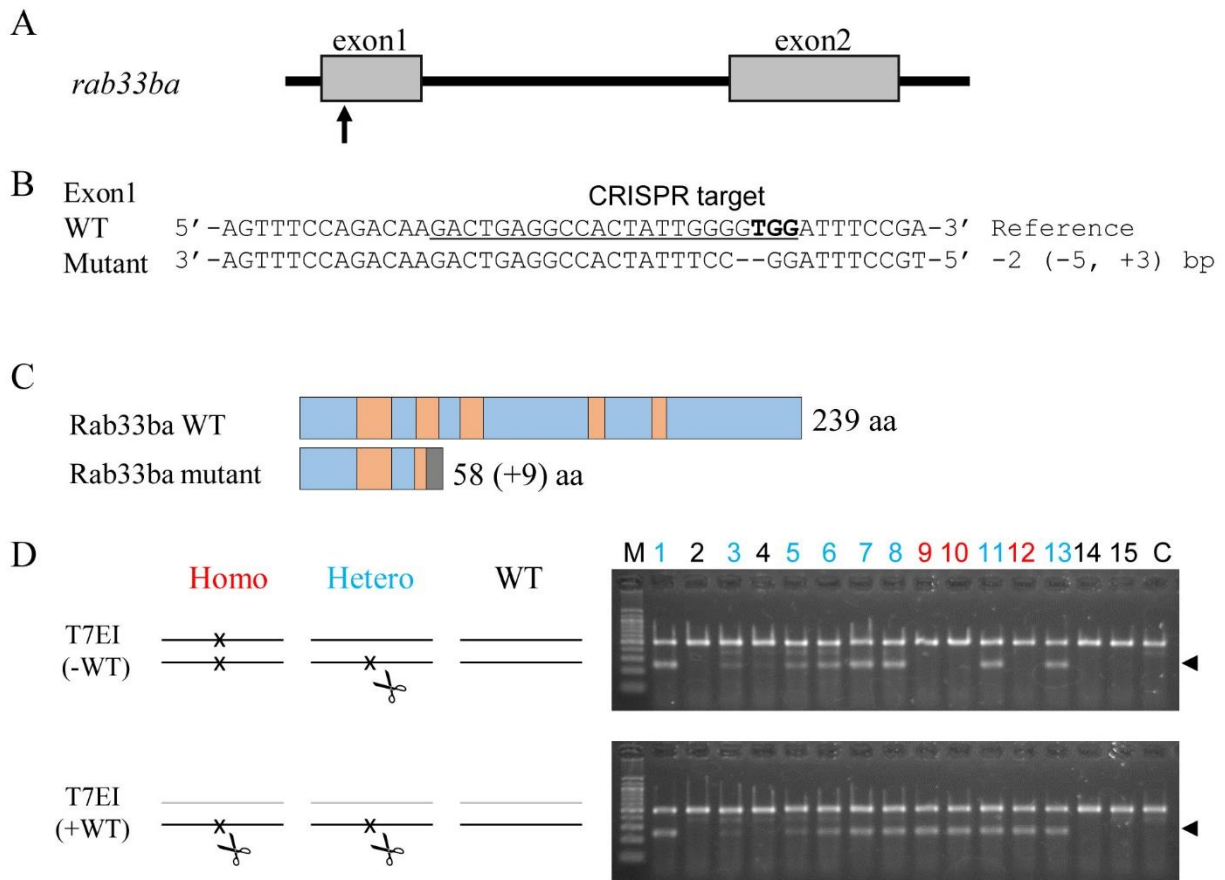


図11. CRISPR/Cas9システムを用いた*rab33ba*変異体の作製

(A) CRISPR/Cas9システムの*rab33ba*のターゲット。

(B) 野生型と変異体の*rab33ba*の塩基配列。5塩基の欠失と3塩基の挿入が見られた。

(C) 予想されるRab33ba野生型と変異体のタンパク質構造。

(D) T7EIアッセイにより*rab33ba*遺伝子型の決定。PCR反応は、*rab33ba*特異的プライマーを用いて行った。PCR産物は、野生型PCR産物 (-WT) または野生型PCR産物 (+WT) を用いずに変性および再アニーリングした。アニーリングされた二本鎖DNAをT7EIで処理し、2.5%アガロースゲル中で電気泳動により分析した。矢印はT7EI消化バンドを示す。異なる色のレーン番号は、ホモ接合体 (赤色)、ヘテロ接合体 (青色) および野生型 (黒色) の異なる遺伝的背景を示す。M: DNAマーカー; Cは、対照として野生型ゲノムDNA鋳型を用いて得られたPCR産物である。

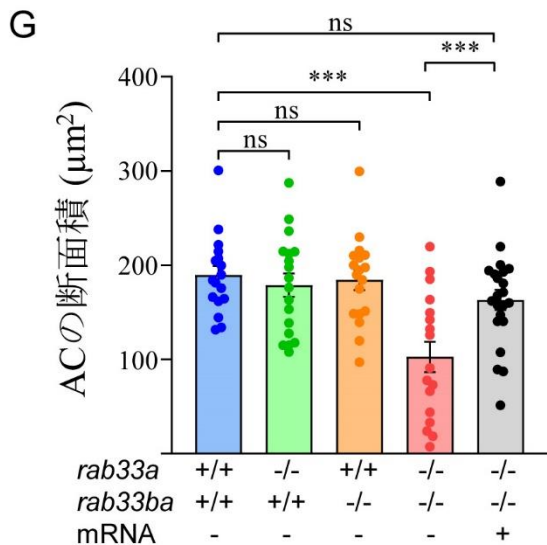
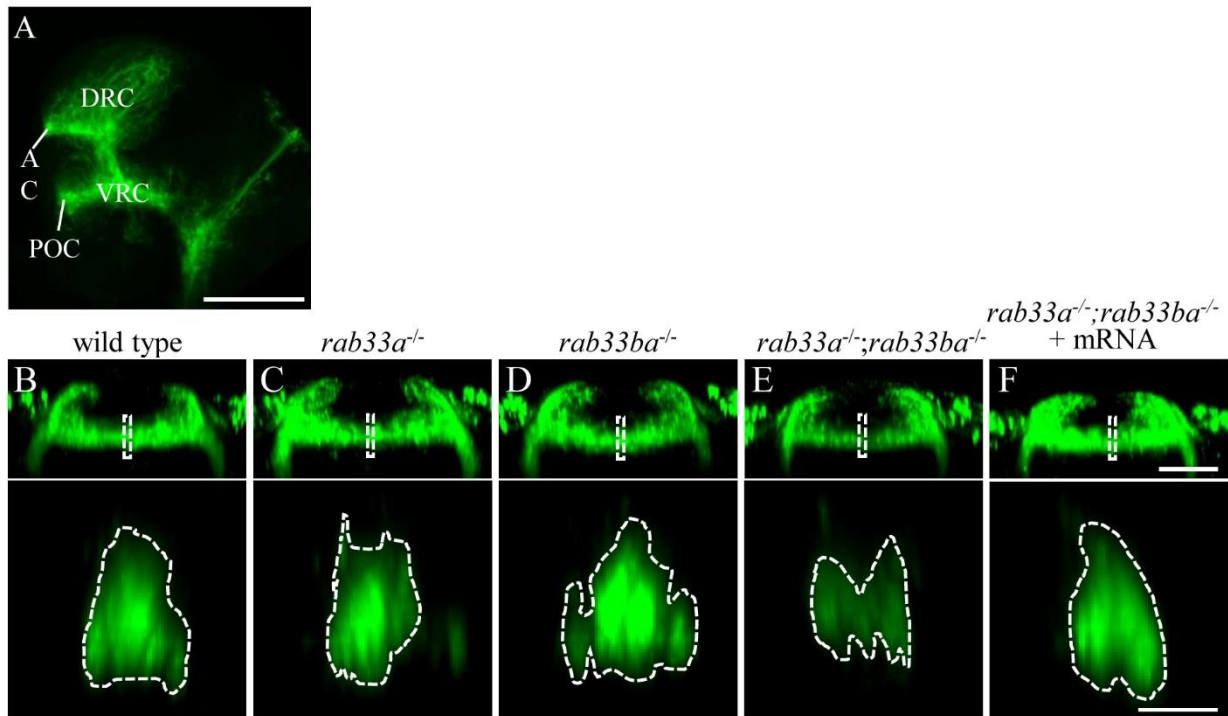


図12. *rab33a*^{-/-};*rab33ba*^{-/-}二重変異体にはanterior commissure (AC) の断面積が減少する。
 (A) 抗アセチル化チューブリン抗体で免疫標識された受精後36時間の野生型ゼブラフィッシュ脳の前側面図。略語：AC、anterior commissure; POC、postoptic commissure、DRC : DorsoRostral Cluster、VRC : VentroRostral Cluster。Scale bar : 100μm。野生型(B)、*rab33a*^{-/-}変異体 (C)、*rab33ba*^{-/-}変異体 (D)、*rab33a*^{-/-};*rab33ba*^{-/-}二重変異体(E) 胚。(F)では、*rab33a*^{-/-};*rab33ba*^{-/-}二重変異体胚に*rab33a*と*rab33ba*のmRNAを微量注入した。上のパネルはACの正面図。Scale bar : 50 μm。下のパネルは断面を示す。Scale bar : 10μm。
 (G) (A-F、下パネル) から得られた前交連の断面積。野生型 (n =17)、*rab33a*^{-/-}変異体 (n =17)、*rab33ba*^{-/-}変異体 (n =18) および*rab33a*^{-/-};*rab33ba*^{-/-}二重変異体 (n = 17) 胚、と*rab33a*および*rab33ba*のmRNAを注入した*rab33a*^{-/-};*rab33ba*^{-/-}二重変異胚 (n = 22) を36 hpfで分析した。データは平均±SEMを表す。***、P <0.01; ns、有意差なし。(one-way ANOVA with Tukey's post hoc test)。

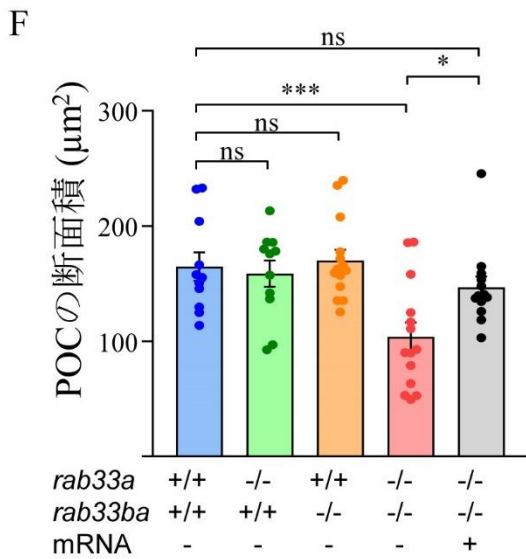
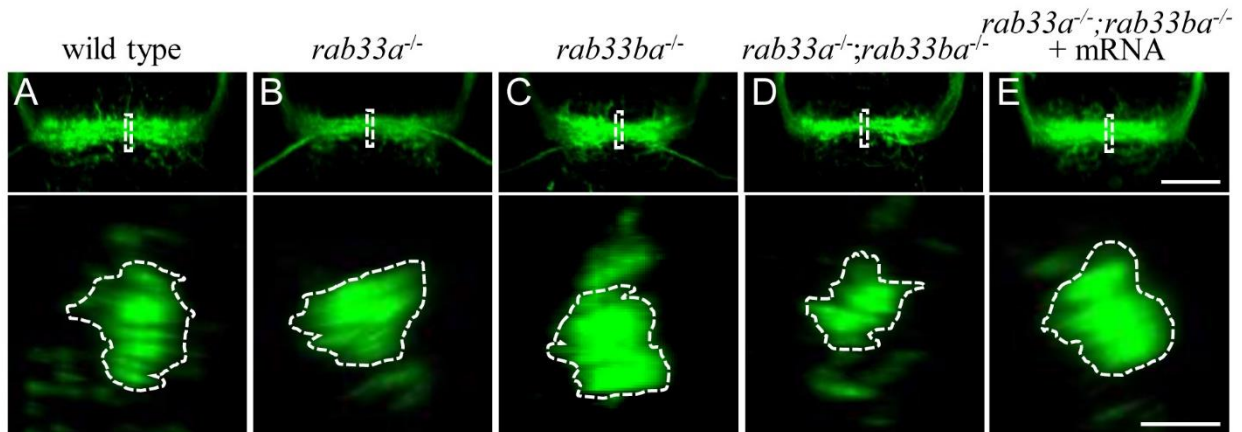


図13. *rab33a*^{-/-};*rab33ba*^{-/-}二重変異体にはpostoptic commissure (POC) の断面積が減少する。野生型 (A)、*rab33a*^{-/-}変異体 (B)、*rab33ba*^{-/-}変異体 (C)、*rab33a*^{-/-};*rab33ba*^{-/-}二重変異体 (D) 胚。

(E) では、*rab33a*^{-/-};*rab33ba*^{-/-}二重変異体胚に*rab33a*と*rab33ba*のmRNAを微量注入した。上のパネルはPOCの正面図。Scale bar : 50 μm。下のパネルは断面を示す。Scale bar : 10 μm。

(F) (A-E、下パネル) から得られたPOCの断面積。野生型 (n = 11)、*rab33a*^{-/-}変異体 (n = 11)、*rab33ba*^{-/-}変異体 (n = 14) および*rab33a*^{-/-};*rab33ba*^{-/-}二重変異体 (n = 14) 胚、と*rab33a* および*rab33ba*のmRNAを注入した*rab33a*^{-/-};*rab33ba*^{-/-}二重変異胚 (n = 13) を解析した。データは平均±SEMを表す。***、P < 0.01; *、P < 0.05; ns、有意差なし。(one-way ANOVA with Tukey's post hoc test)。

関与していることを示唆している。そして、*rab33a* と *rab33ba* がこの表現型と関与しているかを確かめるために、*rab33a^{-/-};rab33ba^{-/-}* の二重変異体の胚に *rab33a* と *rab33ba* の mRNA を微量注入した。その結果、*rab33a^{-/-};rab33ba^{-/-}* 二重変異体に *rab33a* mRNA と *rab33ba* mRNA をインジェクションした胚の POC の断面積は 146.8 ± 9.42 (図 13E, n=13) であり、二重変異体胚と比べて、POC の断面積の減少がレスキューされた (図 13F, $P < 0.05$)。これらの結果から、*rab33a* と *rab33ba* が POC の形成に関与することが示唆された。

***rab33a* と *rab33ba* は DRC 神経細胞の軸索伸長に関与する**

rab33a^{-/-};rab33ba^{-/-} 二重変異体における AC および POC の発育異常から、これらの分子が前脳交連軸索の伸長に関与する可能性があると考えられる。先行研究で、Gal4/UAS システムを用いて、AC における軸索を追跡する方法が報告されている (Zhang *et al.*, 2012)。すなわち、DRC 神経細胞で特異的発現する遺伝子 *emx3* を利用して、プラスミド *emx3:Gal4FF* を構築し、このプラスミドを UAS:tdTomato と一緒にゼブラフィッシュの受精卵にインジェクションすることにより、DRC 神経細胞特異的に Gal4FF タンパク質を発現させている。この Gal4FF タンパク質がさらに UAS プロモーターを活性化し、tdTomato を大量に発現させ、一細胞レベルの DRC 神経細胞の軸索を可視化することができる (図 14)。そこで、本研究では、同様の手法を用いて、AC における DRC ニューロンからの軸索の形成を追跡した。標識された神経細胞の細胞質を座標の原点として、軸索の投射経路をトレースした (図 15B、D)。その結果、受精後 36 時間の野生型胚において、標識された軸索の大部分が終脳の反対側の DRC 領域に投射していることが観察された (図 15B)。AC における軸索の長さは $209.2 \pm 13.1 \mu\text{m}$ (n=9) であった (図 15B)。一方、*rab33a^{-/-};rab33ba^{-/-}* 二重変異体の AC における軸索の伸長が抑制され、反対側の領域への投射に障害が見られた (図 15D)。その長さは、 $114.5 \pm 20.9 \mu\text{m}$ (n=9) であり、野生型と比べて、有意に短かった (図 15E, $P < 0.01$)。これらの結果から、Rab33a および Rab33ba が AC 軸索の伸長に関与していることが示唆された。

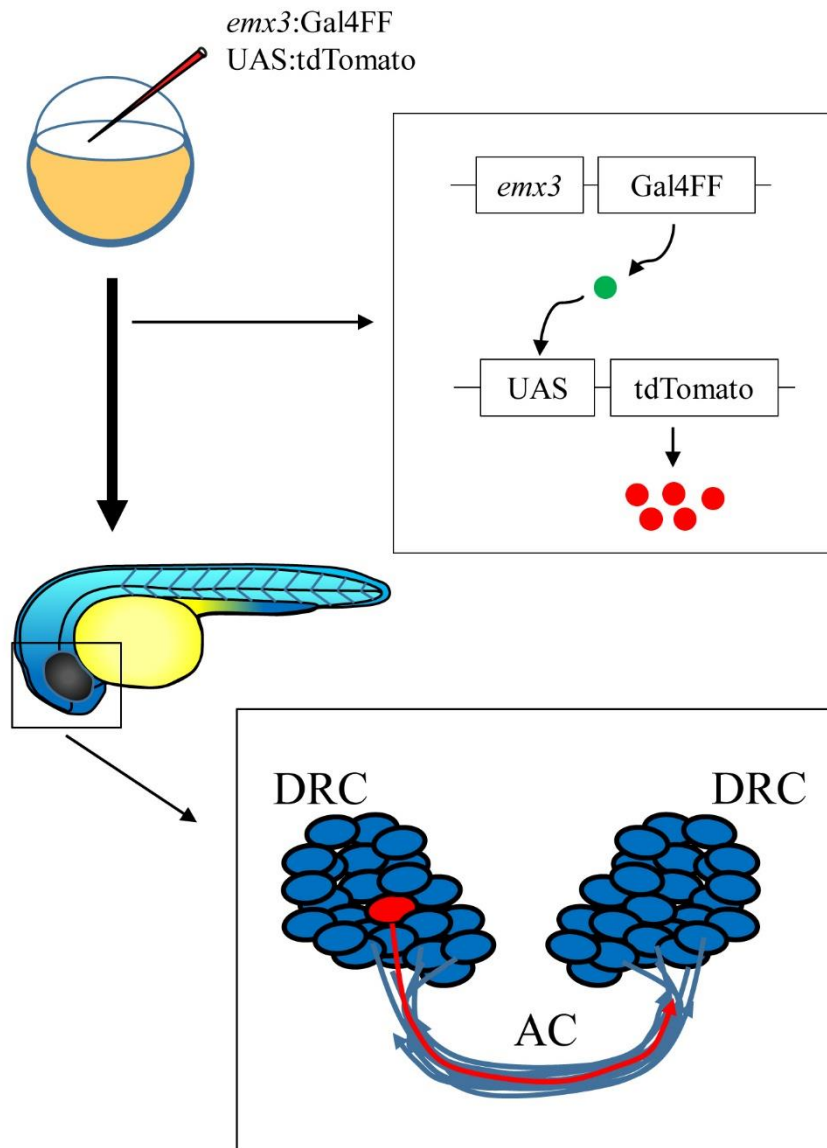
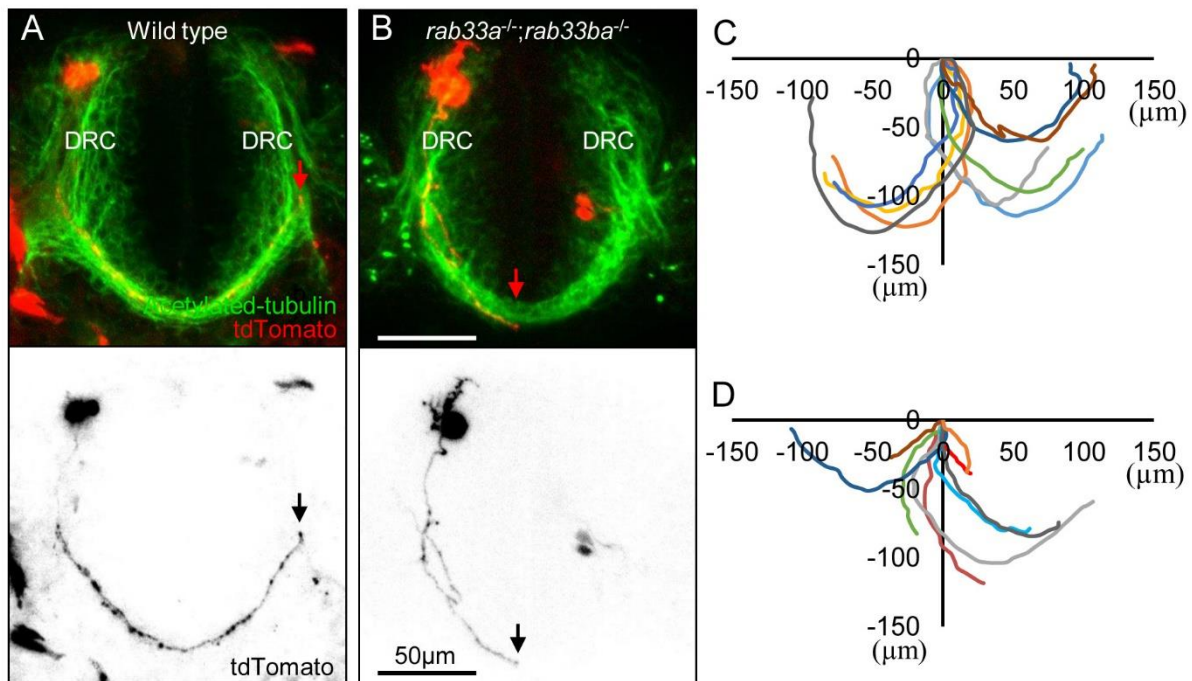


図14.単一細胞標識の原理。

受精後1細胞期胚の細胞質に*emx3:Gal4FF*と*UAS:tdTomato*を微量注入した。*emx3*は前脳DRC領域の神経細胞に特異的に発現する遺伝子である。*emx3*をプロモーターとして、DRC領域にGal4FFタンパク質を発現させた。Gal4FFタンパク質がUASプロモーターを活性化し、tdTomatoを大量に発現させた。このGal4/UASシステムを利用し、DRC領域の神経細胞とその軸索を可視化した。

受精後約24時間に、微量注入を行った胚の前脳を実体顕微鏡で観察し、1細胞だけが標識されている胚を収集した。受精後36時間後に固定し、抗アセチル化チューブリンで免疫染色を行い、前脳交連を可視化した。そして、共焦点顕微鏡で観察した。



E

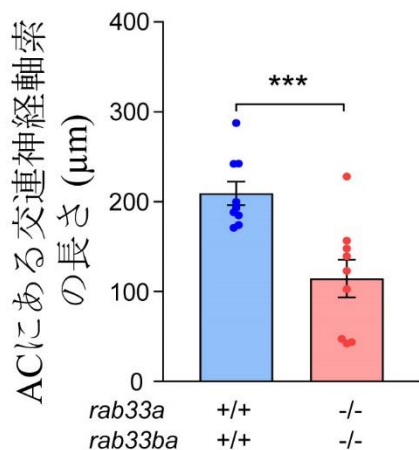


図15. *rab33a;rab33ba*二重変異体ではACの軸索の長さが短くなった。

(A) 野生型胚において、単一細胞標識されたDRC神経細胞 (tdTomato) と抗アセチル化チューブリンに免疫染色されたACの背面図 (上のパネル)。下のパネルは上パネルのtdTomato標識された神経細胞のみを示す。軸索の先端は矢印で示されている。

(B) *rab33a^{-/-};rab33ba^{-/-}*二重変異体胚において、単一細胞標識されたDRC神経細胞 (tdTomato) と抗アセチル化チューブリンに免疫染色されたACの背面図 (上のパネル)。下のパネルは上パネルのtdTomato標識された神経細胞のみを示す。軸索の先端は矢印で示されている。 Scale bar : 50 μm。

(C) 野生型胚でtdTomatoに標識されたDRC神経細胞の軸索の軌跡。細胞体の位置を (x = 0 μm、y = 0 μm) とした。

(D) *rab33a^{-/-};rab33ba^{-/-}*二重変異体胚でtdTomatoに標識されたDRC神経細胞の軸索の軌跡。

(E) 野生型 (n = 9) と *rab33a^{-/-};rab33ba^{-/-}*二重変異体 (n = 9) 胚におけるDRC神経細胞の軸索の長さ。データは平均±SEMを表す。***、P < 0.01。 (unpaired Student's *t* test)。

考察

Rab33 はゼブラフィッシュの前脳交連の形成に関与する

神経細胞において、軸索と樹状突起の極端な表面積比の差は、特定の膜区画に向かう小胞によって制御され、膨大な量の膜成分の輸送により生じる。本研究室の先行研究で、*rab33a* が軸索伸長と形成が盛んな時期において、発現量が上昇し、ゴルジ体から軸索先端への膜成分の供給に関与することが報告されている (Nakazawa et al., 2012)。さらに、Rab33a の発現が抑制された神経細胞では、軸索の形成と伸長が抑制されている。これらの結果から、Rab33a は軸索の先端への膜輸送を介して軸索の伸長と形成を制御していることが示唆されている (Nakazawa et al., 2012)。しかし、生体内において、*rab33a* はどこで発現しているか、どのような役割を果たしているのかは、明らかになっていなかった。

本研究により、*rab33a* と *rab33ba* が受精後 24 時間から 36 時間のゼブラフィッシュの前脳に発現することがわかった。特に終脳 DRC および間脳 VRC 領域において、*rab33a* と *rab33ba* の局在が見られた。ゼブラフィッシュにおいて、DRC と VRC 領域の神経細胞は受精後約 24 時間から軸索を伸長し、前脳交連である AC と POC を形成して、反対側の脳半球へと軸索を投射する。(Barresi, 2005; Chitnis and Kuwada, 1990; Wilson et al., 1990)。これにより、前脳左右半球の情報交換が可能になる。本研究で AC と POC を解析したところ、*rab33a^{-/-};rab33ba^{-/-}* 二重変異体胚で、AC および POC の太さが減少することがわかった。これらの結果から、Rab33a および Rab33ba が、ゼブラフィッシュの脳発生において、前脳交連の形成に関与することが示唆される。私が知る限りでは、本研究は Rab33a が *in vivo* で組織形成を仲介することを示す最初の報告である。

Rab33 はゼブラフィッシュの前脳交連の軸索の伸長に関与する

これまで培養海馬神経細胞を用いた研究の結果、Rab33a は軸索の伸長と形成に関与することがわかっている (Nakazawa et al., 2012) が、生体内における Rab33 の機能はまだわかっていない。近年、ゼブラフィッシュにおける一細胞標識 (Zhang et al., 2012) という手法の樹立により、ゼブラフィッシュの前脳 DRC 神経細胞の軸索を直接で観察することが可能になった。本研究で、この手法を用いて、AC における軸索を解析したところ、*rab33a^{-/-};rab33ba^{-/-}* 二重変異体胚には、標識された軸索が、野生型と比べて、短くなっていた。本来、終脳の左右半球を繋がる軸索が十分伸長できず、反対側の半球への投射に障害が見られた。これらの結果から、Rab33a と Rab33ba は、ゼブラフィッシュの生体内でも軸索の伸長に関与することが示唆される。

軸索の形成に関する Rab33b のメカニズムについて

Rab33a と Rab33ba を介した軸索伸長の分子メカニズムに関して、*rab33a^{-/-};rab33ba^{-/-}* 二重変異体は前脳交連の異常を示したが、*rab33a* 単独変異体および *rab33ba* 単独変異体は顕著な欠陥を示さなかった。Rab33a と Rab33ba との間の機能的重複は、これらの分子が同様の機構を介して軸索伸張を促進する可能性を示唆している。私の所属する研究室の先行研究では、培養ラット海馬ニューロンにおける Rab33a が、ポストゴルジ小胞の順行性軸索輸送およびそれに付随する成長円錐でのエキソサイトーシスを仲介することにより、軸索伸長を促進することを報告した (Nakazawa *et al.*, 2012)。よって、ゼブラフィッシュ Rab33a は、ポストゴルジ小胞の軸索輸送を仲介することにより、前脳交連の軸索の伸長を促進する可能性があると考えられる。さらに、哺乳類の Rab33b もゴルジ装置に局在する (Itoh *et al.*, 2008; Valsdottir *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 1998) ので、ゼブラフィッシュ Rab33ba も同様の機構で軸索の伸長を促進する可能性がある。現在のところ、ポストゴルジの小胞輸送を仲介する Rab33a のエフェクターについては不明である。また、Rab33a と Rab33ba が、どのように軸索伸長を促進するのかについての詳細なメカニズムの解明は残された課題である。

脳形成以外の *rab33b* の役割の可能性

Rab33b は、マウスにおいて、脳、心臓、肝臓、胃、筋肉、生殖器などで発現することが報告されている (Zheng *et al.*, 1998)。これまでに、Smith-McCort 異形成症の患者から五種類の RAB33B の変異が報告されている (Alshammari *et al.*, 2012; Dupuis *et al.*, 2013; Salian *et al.*, 2017)。Smith-McCort 異形成症の症状は、樽状胸を伴う短軀小人症であり、四肢短縮、脊椎後側弯と骨盤の縮小などの骨形成異常であり、精神遅滞や知能の障害がないと報告されている (Smith, Roy and McCort, 1958)。ゼブラフィッシュおよびマウスにおいて、Rab33b が脳以外の組織で発現していること、骨形成に異常を生じるヒトの Smith-McCort 異形成症の原因の候補遺伝子の 1 つになっていることから、Rab33b が脳以外の組織形成に関与する可能性もあると考えられる。さらに、一部の *rab33a^{-/-};rab33ba^{-/-}* 二重変異体胚では、体と尻尾の彎曲と形成不全が見られたことから、*rab33a* と *rab33ba* がゼブラフィッシュの体幹と尻尾の形成に関与する可能性があると考えている。この可能性については今後の課題である。

まとめ

本研究では、ゼブラフィッシュを用いて、発生過程における *rab33a* と *rab33ba* の発現および機能の解析を行った。遺伝子発現解析により、*rab33a* と *rab33ba* は発生過程の脳で発現していた。終脳の DRC の神経細胞は AC へ、間脳の VRC

の神経細胞は POC に軸索を伸ばすことが知られているが、*rab33a* と *rab33ba* は DRC と VRC で発現していた。ゼブラフィッシュ変異体を用いた遺伝子機能解析により、*rab33a;rab33ba* 二重変異体における AC と POC の太さは、野生型と比べて、有意に減少していた。さらに、単一細胞標識解析により、二重変異体の AC における軸索の長さが野生型に比べて有意に減少することがわかった。これらの結果から、**Rab33a** と **Rab33ba** は脳発生過程の軸索伸長および前脳交連の形成に関与することが示唆された。本研究は、**Rab33a** が *in vivo* で軸索伸長を仲介すること、**Rab33b** が軸索伸長に関与していることを示す初めての報告である。

表1. 本研究を用いたオリゴヌクレオチドリスト

Primer	Sequence (5' to 3')
rab33a-h (BamHI)	aaaggatccgccaccATGGCAAATGAATTCTCAGAAAACA
rab33a-t (XbaI,NotI)	tttgcgccgctctagaTCAGCACGGGCAGTACTCTTGGG
rab33ba-h (BamHI)	tttgatccgccaccATGGCAGATATCGAGTCCTCTTTTGA
rab33ba-t (XbaI,NotI)	aaagcggccgctctagaTTAGCTTCTCCAACAACCGCAGC
rab33bb-h (BamHI)	aaaggatccgccaccATGGATTTCGTCTTTAGAAAGCTC
rab33bb-t(XbaI,NotI)	tttgcgccgctctagaTTATAACCCGTGCCTGGATT
rab33a-f	TAGGGAGGTGGCATGGCGTGAGT
rab33a-r	AAACACTCACGCCATGCCAACCTC
rab33ba-f	TAGGACTGAGGCCACTATTGGGG
rab33ba-r	AAACCCCAATAGTGGCCTCAGT
rab33a-5'	CTTAAATCAACTACATCAGTTGGCAAACAC
rab33a-3'	TCCACCGCTTTCTCCCTGAAATCCACGCCG
rab33ba-5'	CGGCATTACTACATTTGCACGGTGTGACGC
rab33ba-3'	ACGGTCACAGTACAAAAATGAACAAATG
EF1a-rt-r1	AGCGGTACTACTCTTCTTGATGC
EF1a-rt-fl	TTGTACACATCCTGAAGTGGCA
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT

表2. PCR産物の増幅条件

PCR産物	酵素名	使用プライマー	アニーリング 温度	伸長時間	サイクル 数
RT-PCR	KOD-plus neo				
<i>rab33a</i>		rab33a-h,rab33a-t	55 °C	30sec	35c
<i>rab33ba</i>		rab33ba-h,rab33ba-t	60 °C	30sec	35c
<i>rab33bb</i>		rab33bb-h,rab33bb-t	55 °C	30sec	35c
Genotyping	TaKaRa Taq				
<i>rab33a</i>		rab33a-5', rab33a -3'	55°C	45s	35c
<i>rab33ba</i>		rab33ba-5', rab33ba-3'	55°C	45s	35c

表3. 系統発生解析に用いたタンパク質配列のアクセッション番号。

Name	Accession numbers
<i>Danio rerio</i> (zebrafish) Rab33a	ENSDARG00000057394 711bp_1
<i>Danio rerio</i> (zebrafish) Rab33ba	ENSDART00000074116.5_1
<i>Danio rerio</i> (zebrafish) Rab33bb	Addgene plasmid#80524
<i>Danio rerio</i> (zebrafish) Rab5aa	ENSDART00000034124.8
<i>Danio rerio</i> (zebrafish) Rab6a	ENSDART00000171392.2
<i>Danio rerio</i> (zebrafish) Rab11a	ENSDART00000060766.4
<i>Danio rerio</i> (zebrafish) Rab27a	ENSDART00000165301.2
<i>Danio rerio</i> (zebrafish) Rab27b	ENSDART00000193570.1
<i>Homo sapiens</i> (human) RAB33A	ENST00000257017.4_1
<i>Homo sapiens</i> (human) RAB33B	ENST00000305626.5_1
<i>Homo sapiens</i> (human) RAB6A	ENST00000310653.10
<i>Rattus norvegicus</i> (Rat) Rab33a	ENSRNOT00000008868.4
<i>Rattus norvegicus</i> (Rat) Rab33b	ENSRNOT00000017396.5
<i>Mus musculus</i> (mouse) Rab33a	ENSMUST00000033430.2_1
<i>Mus musculus</i> (mouse) Rab33b	ENSMUST00000054387.7_1
<i>Mus musculus</i> (mouse) Rab6a	ENSMUST00000107048.7
<i>Canis lupus familiaris</i> (dog) Rab33a	ENSCAFT00000029768.2
<i>Gallus gallus</i> (chicken) Rab33a	ENSGALT00000040577.3
<i>Gallus gallus</i> (chicken) Rab33b	ENSGALT00000015926.3
<i>Takifugu rubripes</i> (fugu) Rab33a	ENSTRUT00000015022.1_1
<i>Takifugu rubripes</i> (fugu) Rab33ba	ENSTRUT00000017361.1
<i>Oryzias latipes</i> (medaka) Rab33a	ENSORLTL00000011342.1_1
<i>Oryzias latipes</i> (medaka) Rab33ba	ENSORLTL00000013348.1 1

謝辞

本研究を進めるにあたって、稲垣直之教授には、快適な研究環境を与えてくださったこと、また本研究を進めるにあたっての指針をご指導いただきました。稲垣教授には、心より御礼申し上げます。直接指導して頂いた浦崎明宏助教には、実験の基本的な操作、本研究への指針や、助言からサイエンティフィックな日本語まで教えていただきました。心より感謝しております。

遺伝子発現制御学研究室の別所康全教授、機能ゲノム医学研究室の石田靖雅教授には本研究のアドバイザーとして、鋭いご意見を頂くことができました。厚く御礼申し上げます。また、遺伝子発現制御学研究室の松井貴輝助教には助言を頂きました。心よりお礼申し上げます。さらに、ゼブラフィッシュの扱いを教えて頂いた山田さん、フィッシュルームを管理、維持している別所研のスタッフさんと後輩にお礼申し上げます。

同研究室の阿部幸喜さん、馬場さん、卒業生の先輩たちには、直接的な実験手法や、貴重なご助言をいただき、感謝しております。また、同期の嶺岸くんとは共に切磋琢磨し、充実した研究生活を過ごすことができました。そして、後輩には、ゼブラフィッシュの管理など研究活動のサポートをしていただきました。ありがとうございました。

最後に、日本へ留学をさせて頂き、支えてくれた両親に深く感謝します。

参考文献

- Alshammari, M.J., Al-Otaibi, L., and Alkuraya, F.S. (2012). Mutation in RAB33B, which encodes a regulator of retrograde Golgi transport, defines a second Dyggve-Melchior-Clausen locus. *J. Med. Genet.* *49*, 455–461.
- Barresi, M.J.F. (2005). Hedgehog regulated Slit expression determines commissure and glial cell position in the zebrafish forebrain. *Development* *132*, 3643–3656.
- Burgo, A., Sotirakis, E., Simmler, M.-C., Verraes, A., Chamot, C., Simpson, J.C., Lanzetti, L., Proux-Gillardeaux, V., and Galli, T. (2009). Role of Varp, a Rab21 exchange factor and TI-VAMP/VAMP7 partner, in neurite growth. *EMBO Rep.* *10*, 1117–1124.
- Cheng, E., Trombetta, S.E., Kovacs, D., Beech, R.D., Ariyan, S., Reyes-Mugica, M., McNiff, J.M., Narayan, D., Kluger, H.M., Picardo, M., et al. (2006). Rab33A: characterization, expression, and suppression by epigenetic modification. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 2257–2271.
- Chitnis, B., and Kuwada, J.Y. (1990). Axonogenesis in the brain of zebrafish embryos. *J. Neurosci.* *10*, 1892–1905.
- Craig, A.M., and Banker, G. (1994). Neuronal Polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* *17*, 267–310.
- Dupuis, N., Lebon, S., Kumar, M., Drunat, S., Graul-Neumann, L.M., Gressens, P., and El Ghouzzi, V. (2013). A novel RAB33B mutation in Smith-McCort Dysplasia. *Hum. Mutat.* *34*, 283–286.
- Eva, R., Dassie, E., Caswell, P.T., Dick, G., Ffrench-Constant, C., Norman, J.C., and Fawcett, J.W. (2010). Rab11 and its effector Rab coupling protein contribute to the trafficking of beta 1 integrins during axon growth in adult dorsal root ganglion neurons and PC12 cells. *J. Neurosci.* *30*, 11654–11669.

Fukuda, M. (2008). Membrane traffic in the secretory pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 2801–2813.

Fukuda, M., Kobayashi, H., Ishibashi, K., and Ohbayashi, N. (2011). Genome-wide investigation of the Rab binding activity of RUN domains: Development of a novel tool that specifically traps GTP-Rab35. *Cell Struct. Funct.* *36*, 155–170.

Futerman, A.H., and Banker, G.A. (1996). The economics of neurite outgrowth—the addition of new membrane to growing axons. *Trends Neurosci.* *19*, 144–149.

Gallwitz, D., Donath, C., and Sander, C. (1983). A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-ha/bas proto-oncogene product. *Nature* *306*, 704–707.
Geppert, M., Bolshakov, V.Y., Siegelbaum, S.A., Takei, K., De Camilli, P., Hammer, R.E., and Südhof, T.C. (1994). The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* *369*, 493–497.

Hall, T.E., Martel, N., Lo, H.P., Xiong, Z., and Parton, R.G. (2017). A plasmid library of full-length zebrafish rab proteins for in vivo cell biology. *Cell. Logist.* *7*, e1301151.

Itoh, T., Fujita, N., Kanno, E., Yamamoto, A., Yoshimori, T., and Fukuda, M. (2008). Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2916–2925.

Jao, L.-E., Wente, S.R., and Chen, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 13904–13909.

Kenyon, E.J., Campos, I., Bull, J.C., Williams, P.H., Stemple, D.L., and Clark, M.D. (2015). Zebrafish Rab5 proteins and a role for Rab5ab in nodal signalling. *Dev. Biol.* *397*, 212–224.

Klöpper, T.H., Kienle, N., Fasshauer, D., and Munro, S. (2012). Untangling the evolution of Rab G proteins: implications of a comprehensive genomic analysis. *BMC Biol.* *10*, 71.

- Kobayashi, H., and Fukuda, M. (2012). Rab35 regulates Arf6 activity through centaurin-beta2 (ACAP2) during neurite outgrowth. *J Cell Sci* 125, 2235–2243.
- Lockerbie, R.O., Miller, V.E., and Pfenninger, K.H. (1991). Regulated plasmalemmal expansion in nerve growth cones. *J. Cell Biol.* 112, 1215–1227.
- Mori, T., Wada, T., Suzuki, T., Kubota, Y., and Inagaki, N. (2007). Singar1, a novel RUN domain-containing protein, suppresses formation of surplus axons for neuronal polarity. *J. Biol. Chem.* 282, 19884–19893.
- Nakazawa, H., Sada, T., Toriyama, M., Tago, K., Sugiura, T., Fukuda, M., and Inagaki, N. (2012). Rab33a mediates anterograde vesicular transport for membrane exocytosis and axon outgrowth. *J. Neurosci.* 32, 12712–12725.
- Pfeffer, S.R. (2001). Rab GTPases: Specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol.* 11, 487–491.
- Pfenninger, K.H. (2009). Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 251–261.
- Salian, S., Cho, T., Phadke, S.R., Gowrishankar, K., Bhavani, G.S., Shukla, A., Jagadeesh, S., Kim, O., Nishimura, G., and Girisha, K.M. (2017). Additional three patients with Smith-McCort Dysplasia due to novel RAB33B mutations. *Am J Med Genet A.* 73, 1–8.
- Schlager, M.A., Kapitein, L.C., Grigoriev, I., Burzynski, G.M., Wulf, P.S., Keijzer, N., de Graaff, E., Fukuda, M., Shepherd, I.T., Akhmanova, A., et al. (2010). Pericentrosomal targeting of Rab6 secretory vesicles by Bicaudal-D-related protein 1 (BICDR-1) regulates neuritogenesis. *EMBO J.* 29, 1637–1651.
- Schmitt, H.D., Wagner, P., Pfaff, E., and Gallwitz, D. (1986). The ras-related YPT1 gene product in yeast: A GTP-binding protein that might be involved in microtubule organization. *Cell* 47, 401–412.
- Smith, Roy and McCort, J.J. (1958). Osteochondrodystrophy (Morquio- Bralisford Type). *Calif. Med.* 88, 55–59.

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 513–525.

Tang, B.L. (2001). Protein trafficking mechanisms associated with neurite outgrowth and polarized sorting in neurons. *J. Neurochem.* *79*, 923–930.

Urasaki, A., and Kawakami, K. (2009). Analysis of genes and genome by the Tol2-mediated gene and enhancer trap methods in zebrafish: *Methods and Protocols*, G.J. Lieschke, A.C. Oates, and K. Kawakami, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 85–102.

Urasaki, A., Morvan, G., and Kawakami, K. (2006). Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics* *174*, 639 LP-649.

Valsdottir, R., Hashimoto, H., Ashman, K., Koda, T., Storrie, B., and Nilsson, T. (2001). Identification of rabaptin-5, rabex-5, and GM130 as putative effectors of rab33b, a regulator of retrograde traffic between the Golgi apparatus and ER. *FEBS Lett.* *508*, 201–209.

Wilson, S.W., Ross, L.S., Parrett, T., and Easter, S.S. (1990). The development of a simple scaffold of axon tracts in the brain of the embryonic zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Development* *108*, 121–145.

Winckler, B., and Mellman, I. (1999). Neuronal polarity: controlling the sorting and diffusion of membrane components. *Neuron* *23*, 637–640.

Ye, B., Zhang, Y.W., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2006). The secretory pathway and neuron polarization. *J. Neurosci.* *26*, 10631–10632.

Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 107–117.

Zhang, C., Gao, J., Zhang, H., Sun, L., and Peng, G. (2012). Robo2-Slit and Dcc-netrin1 coordinate neuron axonal pathfinding within the embryonic axon tracts. *J. Neurosci.* *32*, 12589–12602.

Zhen, Y., and Stenmark, H. (2015). Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *J. Cell Sci.* *128*, 3171–3176.

Zheng, J.Y., Koda, T., Fujiwara, T., Kishi, M., Ikehara, Y., and Kakinuma, M. (1998). A novel Rab GTPase, Rab33B, is ubiquitously expressed and localized to the medial Golgi cisternae. *J. Cell Sci.* *111*, 1061–1069.