

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：32601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14373

研究課題名(和文)ロコモティブシンドロームのモデル確立と定量評価および症状を軽減させる化合物の探索

研究課題名(英文)Generation of locomotive syndrome model

研究代表者

平田 普三(Hirata, Hiromi)

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号：60402450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：社会の超高齢化が進む日本で、加齢や運動不足による運動器疾患「ロコモ (locomotive syndrome)」が注目されている。ロコモでは加齢にともない筋が減少するが、その発症機構には不明の点が多い。ロコモを理解するためにはロコモの動物モデルが必要で、研究代表者はゼブラフィッシュを用いた筋の発生や病態の研究経験を活かし、本研究でロコモの動物モデル確立を目指した。筋組織で特異的に機能するプロモーターで核移行型GFP、アクチン線維結合型RFP、細胞膜結合型YFPを発現させ、筋の特性を定量解析する実験系を構築した。実験効率を高める目的で、老化関連遺伝子を破壊して早く老化することになる個体を作製した。

研究成果の概要(英文)：Aging problem is a serious issue in Japan and the word "locomo" is drawing public attention. It is the abbreviation of locomotive syndrome, which is a condition of reduced mobility due to impairment of motor organs such as muscle, joint and bone. To develop a pathophysiological model of locomotive syndrome, we generated transgenic zebrafish expressing nuclear-localizing GFP, plasmamembrane-localizing YFP and filamentous actin-binding RFP in muscle cells. By crossing these lines, we have developed triple transgenic expressing these three fluorescent proteins in the same animals, enabling the visualization of nucleus, plasmamembrane and F-actin in live animals for quantitative analysis. Since studies of natural aging take time, we tried to develop fish models of progeria. Using CRISPR/Cas9 method, we generated several deletion alleles of aging-related genes in zebrafish. By crossing muscle imaging line and progeria model line, we are developing a new tool for locomotive syndrome study.

研究分野：神経生物学

キーワード：遺伝子

1. 研究開始当初の背景

総務省の人口推計によると、日本は2013年に65歳以上の高齢者が総人口の25%を超える超高齢化社会に突入した。2035年には33.4%になり、その後も増え続ける見込みで、日本社会の超高齢化は不可避の問題として深刻に考えられている。近年、「ロコモ」が社会問題として認識されつつある。ロコモとはロコモティブシンドローム (locomotive syndrome) の略で、加齢や運動不足による身体機能低下や運動器疾患と定義されている。具体的には加齢による筋力低下からはじまり、運動能力の低下がつまずき・骨折を引き起こし、それがさらなる運動不足・筋力低下を招き、この悪循環を繰り返すうちに関節拘縮などの障害が併発し、最後には寝たきり・要介護に至るものである。老齢性とされるが、運動不足によっても起こるので、日本人の運動する機会が減っていることもロコモを加速させる原因となっており、成人病「メタボ」となるが国民病となるのは時間の問題である。患者を対象としたロコモの調査が進んでいるが、動物を用いたロコモの実験系は十分には確立されていない。

研究代表者は筋に異常のあるゼブラフィッシュ変異体を単離し、筋組織の形成と維持に必要な遺伝子を同定する研究を行っており、また、ゼブラフィッシュ変異体がヒト疾患のモデルになることにも注目し、アメリカ先住民ミオパチーという遺伝性筋疾患の原因がSTAC3遺伝子の変異であることを発見するなど、発生から病態まで広く筋を研究してきた。一般的に魚をせまい水槽で飼育すると、体が痩せる傾向があり、これはロコモ様の症状であるとも考えられることから、ゼブラフィッシュはロコモ研究に有用な実験動物であると考えられる。本研究では遺伝的操作がしやすい熱帯魚であるゼブラフィッシュをロコモのモデルとして確立することを目指すものである。

2. 研究の目的

ロコモは社会的に少しずつ認知されつつあるが、ロコモを理解し、その軽減を検討するには、ロコモの発症機序を理解する必要がある。それにはモデル動物による解析が有用で、本研究ではゼブラフィッシュを用いたロコモの動物モデル作製を目指す。また、自然加齢による動物個体の老化は大変時間がかかるので、正常なものに比べて早く老化する遺伝的個体を作製する。これらを組み合わせることで、短期間で効率的にロコモを解析する実験系の構築を進める。

3. 研究の方法

筋で特異的にかつ高レベルに、さらに胚期から成魚期までのあらゆるステージで遺伝子発現を誘導するプロモーターを探索し、そのプロモーター下で筋細胞の核、細胞膜、ア

クチン線維を蛍光標識するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製する。その個体を用いて、筋の細胞の数、核の数、アクチンミオシン線維の太さを様々なステージで解析する。

また、老化との関連が指摘される遺伝子をCRISPR/Cas9法で破壊してノックアウトゼブラフィッシュを作製したり、変異型に置き換えるノックインゼブラフィッシュを作製したり、あるいは変異型の遺伝子産物を過剰発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製するなどして、正常個体よりも早く老化が起こるものを得る。それを筋を可視化する系統と交配することで、早く老化する個体で筋の解析をすることを目指す。

4. 研究成果

筋に高発現する遺伝子としてはアクチンやミオシン、筋小胞体カルシウムポンプなど多数の候補があるが、*in situ hybridization*法でこれら遺伝子の発現をさまざまなステージで解析したり、またデータベース上の発現データを比較したりするなどして、アルファアクチンプロモーターが胚期から成魚期までのあらゆるステージで最も転写誘導力が高いと判断した。次にアルファアクチンプロモーター下に核移行型GFP、アクチン線維結合型RFP、細胞膜結合型YFPをつなげた発現コンストラクトを作製し、さらにこれらをゼブラフィッシュでトランスジェニック系統を作製するのに有用なトランスポゾンTol2のライトアームとレフトアームの間に組み込み、Tol2のトランスポザーゼと一緒にゼブラフィッシュ受精卵にインジェクションで導入した。得られた胚のうち稚魚期に筋で蛍光タンパク質を発現するF0個体だけを選別して成魚まで育て、それを野生型成魚と交配させることで、F1世代を得た。F1の中には蛍光タンパク質を高レベルで発現する個体もいれば、低レベルで発現する個体もいたが、高レベルで発現するものだけを選別して成魚まで育て、そのうちの1個体だけを使い系統を確立・維持した。それらの交配を繰り返してトリプルトランスジェニックにして、同一個体で筋細胞の核、アクチン線維、細胞膜を同時に可視化して定量化できるようにした。また、これらの可視化系統にさまざまな化合物を作用させ、筋の形態異常が発生するかを見たところ、複数の化合物で顕著な異常が観察された。

ヒトやマウスで老化に関係する遺伝子が報告されており、loss of functionによって老化が促進する遺伝子に注目し、CRISPR/Cas9法で遺伝子破壊を試みた。また、アミノ酸置換をとともなう点変異によってgain of functionで老化が促進するものについて、CRISPR/Cas9法でノックインを試みた。これまで3遺伝子の破壊を終えており、交配を進めてホモ変異体を得られた。ホモ個体で老化が促進するかは現在解析を進めて

いる。ノックインについては、スクリーニングを続けているところである。これらの複数のアプローチ、複数の遺伝子でのゲノム編集から老化促進個体がまもなく確立するだろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. Nakahata, Y., Eto, K., Murakoshi, H., Watanabe, M., Kuriu, T., Hirata, H., Moorhouse, A. J., Ishibashi, H. and Nabekura, J. (2017) Activation-dependent rapid postsynaptic clustering of glycine receptors in mature spinal cord neurons. *eNeuro*. 4: 1.
2. Ogino, H. and Hirata, H. (2016) Defects of the glycinergic synaptic in zebrafish. *Front. Mol. Neurosci*. 9: 50, 1-18.
3. Boubakri, M., Chaya, T., Hirata, H., Kajimura, N., Kuwahara, R., Ueno, A., Malicki, J., Furukawa, T. and Omori, Y. (2016) Loss of *ift122*, a retrograde intraflagellar transport (IFT) complex component, leads to slow, progressive photoreceptor degeneration due to inefficient opsin transport. *J. Biol. Chem*. 291: 24465-24474.
4. Knierim, E., Hirata, H.*, Wolf, N. I., Morales-Gonzalez, S., Schottmann, G., Tanaka, Y., Rudnick-Schöneborn, S., Orgeur, M., Zerres, K., Vogt, S., van Riesen, A., Gill, E., Seifert, F., Zwirner, A., Kirschner, J., Goebel, H. H., Hübner, C., Stricker, S., Meierhofer, D., Stenzel, W. and Schuelke, M.* (2016) Mutations in subunits of the activating signal cointegrator 1 complex are associated with prenatal spinal muscular atrophy and congenital bone fractures. *Am. J. Hum. Genet*. 98: 473-489. (*Corresponding authors)
5. Kotani, Y., Morito, D.*, Yamazaki, S., Ogino, K., Kawakami, K., Takashima, S., Hirata, H.* and Nagata, K.* (2015) Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, *mysterin/RNF213*. *Sci. Rep*. 5: 16161. (*Corresponding authors)
6. Ogino, K., Low, S. E., Yamada, K.,

Saint-Amant, L., Zhou, W., Muto, A., Asakawa, K., Nakai, J., Kawakami, K. Kuwada, J. Y. and Hirata, H.* (2015) RING finger protein 121 facilitates the degradation and membrane localization of voltage-gated sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 2859-2864. (*Corresponding author)

7. Stöddberg, T.*, McTague, A.*, Ruiz, A. J.*, Hirata, H.*, Zhen, J., Long, P., Farabella, I., Meyer, E., Kawahara, A., Vassallo, G., Stivaros, S. M., Bjursell, M. K., Stranneheim, H., Tigerschiöld, S., Persson, B., Bangash, I., Das, K., Hughes, D., Lesko, N., Lundeberg, J., Scott, R. C., Poduri, A., Scheffer, I. E., Smith, H., Gissen, P., Schorge, S., Reith, M. E. A., Topf, M., Kullmann, D. M., Harvey, R. J., Wedell, A. and Kurian, M. A. (2015) Mutations in *SLC12A5* in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Nature Commun*. 6: 8038. (*Co-first authors)

[学会発表](計11件)

1. Hirata, H and Ogino, K. Phosphorylation of gephyrin regulates plasticity of glycinergic synapse and habituation. The 7th Strategic Conference of Zebrafish Investigators. Asilomar Conference Center. California, USA. January 15, 2017.
2. 平田普三。ゼブラフィッシュを用いた骨格筋細胞の解析。第4回若手による骨格筋細胞研究会。ウイックあいち(名古屋)。2016年11月14日。
3. 平田普三。脳疾患、脊髄変性疾患、筋疾患のゼブラフィッシュモデル。第2回ゼブラフィッシュ創薬研究会。みんなの森ぎふメディアコスモス(岐阜)。2016年11月4日。
4. Ogino, K. and Hirata, H. ER-associated RING finger protein 121 is involved in the intracellular trafficking of voltage-gated sodium channels to the cell membrane. 第89回日本生化学会大会。仙台国際センター(仙台)。2016年9月25日。
5. Tanaka, Y., Kataoka, M., Ogino, K. and Hirata, H. Infrastructure development for sarcopenia study in zebrafish. 第22回小型魚類研究会。岡崎コンファレンスセンター(岡崎)。2016年8月20日。
6. Hirano, Y., Hamakawa, Y., Ogino, K., Fujita, M. and Hirata, H. Functional

- analysis of GPI-anchored protein modification enzymes in zebrafish. 第22回小型魚類研究会。岡崎コンファレンスセンター（岡崎）。2016年8月20日。
7. Matsukawa, E., Ogino, K. and Hirata, H. PKC-mediated declustering of glycine receptor in developing zebrafish larvae. 第22回小型魚類研究会。岡崎コンファレンスセンター（岡崎）。2016年8月20日。
 8. 平田普三。ゼブラフィッシュを用いた運動器の遺伝学的解析。第4回骨格筋生物学研究会。松本大学（松本）。2016年3月5日。
 9. Ogino, K. and Hirata, H. Sound stimulation regulates glycinergic synapse and escape behavior in zebrafish larvae. 第21回小型魚類研究会。大阪大学銀杏会館（吹田）。2015年9月19日。
 10. Hirata, H. Plasticity of glycinergic synapses and related behaviors in zebrafish. The 25th meeting of the International Society for Neurochemistry. Cairns Convention Center. Cairns, Australia. August 24, 2015.
 11. 平田普三。電位依存性ナトリウムチャネルの輸送におけるGPIアンカータンパク生合成の重要性。第34回日本糖質学会年会。東京大学安田講堂（東京）。2015年8月2日。

〔図書〕（計1件）

1. 平田普三。北から南から。生化学 2015年（Vol. 87）第5号、p642。

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ
<http://researchmap.jp/hihirata/>

6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 平田 普三 (HIRATA HIROMI)
 青山学院大学・理工学部
 教授
 研究者番号：60402450

(2) 研究分担者
 なし

(3) 連携研究者
 なし

(4) 研究協力者
 なし