

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：32601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03329

研究課題名(和文) 触覚受容に関わる分子の探索と再構成

研究課題名(英文) Molecular basis underlying mechanoreception

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：触覚は感覚ニューロンが担うが、生体内での触覚の分子機構には不明の点が多い。本研究ではゼブラフィッシュの感覚運動を指標としたアッセイ系を触覚研究に取り入れ、触覚に異常のあるゼブラフィッシュ変異体を足がかりに、触覚に必要な遺伝子を多数同定し、触覚受容における作用機序を明らかにした。一例をあげると、GPIアンカータンパク質の生合成に必要な GPIトランスアミダーゼのサブユニットの一つであるPIGKは、一次感覚ニューロンにおける電位依存性ナトリウムチャンネルの軸作局在を制御することで、触覚に寄与することを見出した。また、PIGK遺伝子のバリエーションがヒトで神経発達障害を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

触覚研究の分野ではPIEZ01という受容体分子は同定されて研究が進展したが、PIEZ01のサブユニットや制御因子など、触覚に関連する分子基盤の知見は今でも少なく、不明の点が多く残されている。皮膚感覚の異常は不快感をまねき、生活の質を著しく低下させることから、触覚の理解はヒトが健康的な生活をおくるのに重要な要素である。本研究で触覚に必要なとわかった遺伝子のヒトでのバリエーションが神経発達障害を引き起こすこともわかり、触覚の研究が触覚分野にとどまらず、広く神経疾患の理解に寄与することが示されたと言える。

研究成果の概要(英文)：Sensory neurons are responsible for tactile perception. But other than the PIEZ01 receptor, the molecular mechanism of tactile perception in vivo remains largely unclear. In this study, we employed zebrafish sensory motor system into tactile research and utilized zebrafish mutants with abnormal tactile sensation. We identified a number of genes required for tactile perception and clarified their roles in tactile reception. For example, we found that PIGK, one of the subunits of GPI transamidase enzyme, which is required for the biosynthesis of GPI-anchored proteins, contributes to tactile perception by regulating the axonal localization of voltage-gated sodium channels in primary sensory neurons. We also found that a variant of the PIGK gene caused neurodevelopmental disorders in humans.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：脳科学

キーワード：神経

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

われわれは外界の情報を得るのに、五感に代表される感覚を使用する。五感とは視覚、聴覚、嗅覚、味覚、触覚のことで、われわれはこれに加えて平衡感覚や内臓感覚、温度感覚、痛覚なども有しており、それぞれの感覚を受容するための感覚器官や受容体を発現する一次感覚ニューロンが存在する。これらの感覚系の中でも触覚については一次感覚ニューロンが知られており、受容体として PIEZO1 が同定されている (2021 年ノーベル医学・生理学賞)。しかし、触覚の受容機構や関連分子、情報伝達機構には不明な点も多く残されている。

### 2. 研究の目的

本研究は触覚を中心に動物の感覚受容の機構を分子的に、また生理的に解明することを目指している。具体的には小型の観賞用淡水性熱帯魚であるゼブラフィッシュを動物モデルとして、触覚の受容や伝達に関与する分子、特に受容機構に直接寄与する分子を探索し、触覚受容のメカニズム理解の深化を目指す。また、Rohon-Beard ニューロンとよばれるゼブラフィッシュの触覚の一次感覚ニューロンは形態や情報伝達の特性が他のニューロンとは異なるという知見を得ており、触覚の一次感覚ニューロンの電気特性に注目してその特殊性を明らかにする。さらに、触覚受容が駆動する運動出力の特性を解析することで、感覚運動の機能的合理性を解析することを目指している。

### 3. 研究の方法

ゼブラフィッシュの雄の成魚にアルキル化剤エチルニトロソ尿素を作用させて、精原細胞に変異を導入した個体の子孫を得ると、変異を導入した個体から 3 世代目で変異をホモにもつ変異体個体を得られる。この世代の胚を 1 個体ずつピンセットでつついて触刺激を与えると、受精後 1 日齢であれば、正常な個体は感覚受容から運動出力までを行えるので、体をひねる逃避運動をするが、触刺激応答に異常のある変異体を得ることができる。受精後 2 日齢であれば、正常な個体は触刺激に応じて左右に尾を振って泳動し、刺激から逃避するが、まったく刺激に応答しない変異体や泳動はするが左右に尾を振るリズムが悪くて前方に進めない変異体、尾を左右に大きく振りすぎてのたうちまわるような動きをする変異体などが得られる。これらの変異体を全ゲノムシーケンスすると、変異を特定することができ、遺伝子をクローニングすることで、責任遺伝子を同定する。責任遺伝子を *in vitro* 転写して作製したプローブを用いて *in situ* hybridization を行うと、責任遺伝子を発現する細胞を特定できるので、一次感覚ニューロンで発現することを確認できる。またさまざまな生理解析を行うことで、変異体では一次感覚ニューロンのどのような生理特性が影響を受けているのかを明らかにすることができる。

### 4. 研究成果

一次感覚ニューロンの機能に異常があるゼブラフィッシュ変異体を 10 系統単離することに成功した。それぞれの責任遺伝子を同定し、解析を進めた。小胞体に存在する酵素であるグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) トランスアミダーゼはタンパク質を GPI に共有結合させ、細胞膜表出させるのに必要であり、PIGK, PIGS, PIGT, PIGU, GPAA1 の 5 つのサブユニットからなる。サブユニットの 1 つをコードする PIGK 遺伝子に変異のある変異体は触刺激に全く応答しなかった。In situ hybridization で PIGK の発現を調べると、PIGK は神経系の広い領域で発現し、特に一次感覚ニューロンである Rohon-Beard ニューロンで特に高い発現を示すことが確認された。mRNA のインジェクションによるレスキュー実験から、PIGK の機能を完全に欠損させると感覚受容は完全に消失するが、ミスセンスによる機能低下型を発現させると部分的なレスキューが可能であるとわかった。電位依存性ナトリウムチャンネルに対する抗体を用いた免疫染色から、PIGK は電位依存性ナトリウムチャンネルの軸作における局在に必要であることがわかった。さらに PIGK を欠損した個体の一次感覚ニューロンの生理解析から、PIGK は電位依存性ナトリウムチャンネルの機能に必要であることも確認された。これらのことから、PIGK は何らかの GPI アンカータンパク質の合成に必要で、その GPI アンカータンパク質が一次感覚ニューロンにおいて電位依存性ナトリウムチャンネルの局在に寄与する可能性が提唱された。神経発達障害や小脳萎縮、けいれんを発症するヒトの患者で PIGK 遺伝子のバリエーションが報告されており、これらの神経症状が電位依存性ナトリウムチャンネルの変異によっても引き起こされることから、PIGK の変異による神経症状の一部は電位依存性ナトリウムチャンネルの局在異常で説明できると考えられる。また、電位依存性ナトリウムチャンネルの軸作局在に必要な GPI アンカータンパク質を同定し、それを GPI アンカー型から細胞膜貫通型に変えて発現させることができれば、電位依存性ナトリウムチャンネルの局在異常をレスキューできる可能性があり、PIGK を含む GPI トランスアミダーゼサブユニットの遺伝子変異による神経疾患の改善する方法の提案につながると期待される。

一次感覚ニューロンの機能に異常がある別のゼブラフィッシュ変異体では、転写因子の変異が同定された。In situ hybridization でその遺伝子の発現を調べると、神経系を含め、全身

で発現が観察された。アンチセンスモルフォリノを用いた遺伝子の機能阻害実験から、当該遺伝子は感覚受容に必要であることが示唆され、感覚受容に必要な分子の発現を制御していると考えられた。発現制御においてこの転写因子の下流に位置し、感覚受容に必要な分子の同定をトランスクリプトーム解析で進め、多くの候補分子を得ており、感覚受容に決定的に必要な単一の分子の同定を進めている。

マウスにはC57BL/6やBALB/cなどの兄妹交配を繰り返して作製された近交系が広く使用されているが、ゼブラフィッシュでは広く使用される近交系は存在していない。近交系は研究の再現性を担保するのに必要で、ゼブラフィッシュを使用する研究者の間で長く望まれてきた。ゼブラフィッシュを用いた感覚受容の研究においても、近交系の使用による研究の再現性確保は重要な課題であった。国立遺伝学研究所との共同研究で、ゼブラフィッシュの近交系開発を進め、20世代以上の兄妹交配による近交系 M-AB を確立し、ゲノム解析を行った。具体的には既知のゼブラフィッシュ系統である AB, TU, RW, WIK, TL, SAT, NHGRI, \*AB, India, TM や系統不詳の PET を入手し、各系統3個体以上の尾部からゲノムを抽出し、次世代シーケンサを使ってゲノムシーケンスを行った。得られたゲノムデータから SNP を検出し、その位置やユニークさを解析することで、ゲノムの系統比較を行った。系統樹を作成すると、M-AB は親系統である \*AB に近いことがわかった。既知の系統との関係においても、AB, TU, SAT, NHGRI などと比較的近く、WIK から遠縁であることが確認された。ゲノムのホモ度に注目すると、M-AB は他の系統と比較して、きわめて高度にゲノムがホモ化されていることがわかった。これらの結果から、M-AB はたしかに近交系として確立されたことが確認された。さらに M-AB 系統の複数個体で保存されたユニークな SNP の同定から、M-AB で共通して破壊された遺伝子を探索すると、生殖関連の遺伝子でミスセンス変異が見つかり、生殖機能が低下している可能性が示唆された。しかし、M-AB の維持において著しい近交弱性は見られず、M-AB は近交系として使いやすいことがわかった。M-AB の仔魚における感覚受容や感覚運動は他の系統と同じだった。また、成魚の行動も他の系統との差は見られてなかった。ここで開発された M-AB はさまざまなゼブラフィッシュ研究に有用で、感覚受容や感覚運動の研究に限らず、広くゼブラフィッシュを用いた研究に使われることになるだろうと期待される。この研究成果は国立遺伝学研究所や慶應義塾大学、東邦大学との共同研究としてサイエンティフィックリポート誌に掲載され、オープンアクセスで公開されている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Ogura Yurie, Uehara Tomoko, Ujibe Kota, Yoshihashi Hiroshi, Yamada Mamiko, Suzuki Hisato, Takenouchi Toshiki, Kosaki Kenjiro, Hirata Hiromi	4. 巻 188
2. 論文標題 The p.Thr395Met missense variant of NFIA found in a patient with intellectual disability is a defective variant.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 1184 ~ 1192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.62638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Reid Kimberley M., Spaul Robert, Salian Smrithi, Barwick Katy, Meyer Esther, Zhen Juan, Hirata Hiromi, et al.	4. 巻 37
2. 論文標題 MED27, SLC6A7, and MPPE1 variants in a complex neurodevelopmental disorder with severe dystonia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Movement Disorders	6. 最初と最後の頁 2139 ~ 2146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mds.29147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kashima Makoto, Kamitani Mari, Nomura Yasuyuki, Mori-Moriyama Natsumi, Betsuyaku Shigeyuki, Hirata Hiromi, Nagano Atsushi J.	4. 巻 18
2. 論文標題 DelTa-Seq: direct-lysate targeted RNA-Seq from crude tissue lysate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Methods	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13007-022-00930-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sadamitsu Kenichiro, Shigemitsu Leona, Suzuki Marina, Ito Daishi, Kashima Makoto, Hirata Hiromi	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization of zebrafish GABAA receptor subunits	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84646-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ujibe Kota、Nishimura Kanako、Kashima Makoto、Hirata Hiromi	4. 巻 11
2. 論文標題 Direct-TRI: High-throughput RNA-extracting Method for all Stages of Zebrafish Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.4136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uehara Tomoko、Sanuki Rikako、Ogura Yurie、Yokoyama Atsushi、Yoshida Takeshi、Futagawa Hiroshi、Yoshihashi Hiroshi、Yamada Mamiko、Suzuki Hisato、Takenouchi Toshiki、Matsubara Kohei、Hirata Hiromi、Kosaki Kenjiro、Takano Shimizu Toshiyuki	4. 巻 185
2. 論文標題 Recurrent NFIA K125E substitution represents a loss-of-function allele: Sensitive in vitro and in vivo assays for nontruncating alleles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 2084 ~ 2093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.62226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogura Yurie、Kaneko Ryoji、Ujibe Kota、Wakamatsu Yuma、Hirata Hiromi	4. 巻 11
2. 論文標題 Loss of klotho causes reduced motor ability and short lifespan in zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-93909-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogura Yurie、Uehara Tomoko、Ujibe Kota、Yoshihashi Hiroshi、Yamada Mamiko、Suzuki Hisato、Takenouchi Toshiki、Kosaki Kenjiro、Hirata Hiromi	4. 巻 188
2. 論文標題 The p.Thr395Met missense variant of NFIA found in a patient with intellectual disability is a defective variant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 1184 ~ 1192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.62638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sadamitsu Kenichiro, Shigemitsu Leona, Suzuki Marina, Ito Daishi, Kashima Makoto, Hirata Hiromi	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization of zebrafish GABAA receptor subunits	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84646-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wakamatsu Yuma, Kashima Makoto, Hirata Hiromi	4. 巻 10
2. 論文標題 A Reproducible Protocol to Measure the Critical Swimming Speed of Adult Zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3712	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito Daishi, Kawazoe Yoshinori, Sato Ayato, Uesugi Motonari, Hirata Hiromi	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of the hypertension drug niflumic acid as a glycine receptor inhibitor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70983-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maeta Masanari, Kataoka Miku, Nishiya Yusuke, Ogino Kazutoyo, Kashima Makoto, Hirata Hiromi	4. 巻 10
2. 論文標題 RNA polymerase II subunit D is essential for zebrafish development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70110-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Jun-ichi, Nanatsue Kentaro, Yamagishi Ryosuke, Ito Mikako, Haga Nobuhiko, Hirata Hiromi, Ogi Tomoo, Ohno Kinji	4. 巻 2
2. 論文標題 InMeRF: prediction of pathogenicity of missense variants by individual modeling for each amino acid substitution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NAR Genomics and Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nargab/lqaa038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Rauschenberger Vera, von Wardenburg Niels, Schaefer Natascha, Ogino Kazutoyo, Hirata Hiromi, Lillesaar Christina, Kluck Christoph J., Meinck Hans Michael, Borrmann Marc, Weishaupt Andreas, Doppler Kathrin, Wickel Jonathan, Geis Christian, Sommer Claudia, Villmann Carmen	4. 巻 88
2. 論文標題 Glycine Receptor Autoantibodies Impair Receptor Function and Induce Motor Dysfunction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 544 ~ 561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.25832	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 平田 普三
2. 発表標題 ゼブラフィッシュが環境に適応して行動を変化させる分子メカニズム
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 平田 普三	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 148
3. 書名 ゼブラフィッシュ実験ガイド	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------