

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06658

研究課題名(和文)メダカを活用した脊椎動物寿命解析系の確立

研究課題名(英文) Establishment of medaka lifespan measurement system

研究代表者

石川 時郎 (Ishikawa, Tokiro)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：70632545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、寿命が比較的短い脊椎動物であるメダカをモデルとして老化や寿命解析を可能にすることを目標とした。

まず、老化細胞のマーカーであるp16遺伝子のメダカホモログを同定し、p16の発現制御領域とVENUSを結合したコンストラクトを導入された遺伝子導入メダカの作出に成功した。

また、摂取カロリーがメダカ寿命に与える影響を確認するため、様々な量でメダカを飼育することで、高量の餌と比較して低量の餌を与えた場合においてメダカの寿命が伸びることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化や寿命のメカニズムを短期間で解析するためには短期間に自然老化する生き物を用いることが望ましい。本研究ではメダカを用いることで寿命・老化解析が行えるかを検証した。

まず、メダカにおける老化細胞マーカー遺伝子ホモログのクローニングに成功したため、これを用いた老化細胞生成メカニズムの解析が可能になった。また、餌の量を変化させることで寿命が変化することが観察できた。これらによりメダカを用いた寿命・老化解析を行うための手法が一部確立された。

研究成果の概要(英文)：This project aims to enable the analysis of aging and longevity using medaka fish, a vertebrate with a relatively short life span.

First, we identified a medaka homolog of the p16 gene, a marker of senescent cells. Then, we created transgenic fish harboring a Venus fluorescent protein gene under the p16 promoter. Finally, to determine the effect of caloric intake on the lifespan of medaka, we kept medaka with various amounts of food.

We confirmed that medaka's lifespan was extended when they were fed less food than when they had more food.

研究分野：細胞生物学

キーワード：メダカ 老化 寿命

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

老化は生物の宿命であり、そのプロセスを明らかにし、生物寿命に介入することは生物学における重要な課題の一つである。近年、生体内に老化細胞が蓄積することが、個体老化をも促進することが報告されている。また、種を問わず、カロリー制限により、寿命が増加することが知られている。

老化研究には線虫やショウジョウバエが用いられるが、これらは脊椎動物でない。また、マウスは哺乳類動物のスタンダードであるものの、多数の個体を用いた解析には適していなかった。

2. 研究の目的

本研究では脊椎動物であるメダカに着目した。メダカは小型であるため少ないスペースでたくさんの個体が飼育可能であるうえ遺伝子改変が可能であり、大変に有用なモデル生物である。また、私達哺乳類と同様に脊椎動物であることから、メダカで得られた知見の多くは脊椎動物に共通の知見として考えることができる。

本研究ではメダカによる上述の老化細胞除去あるいはカロリー制限による寿命延長系を用いた寿命研究を目的とし、それに必要なツールおよびプロトコルの確立を目指した。

3. 研究の方法

- (1) メダカにおける老化細胞マーカーである p16^{INK} ホモログをクローニングする。
- (2) p16^{INK} の制御領域をクローニングし、p16^{INK} が受ける発現制御により蛍光タンパク質を発現する系統を作出する。
- (3) p16^{INK} 制御下でアポトーシスを薬剤依存的に誘導できる系統を作出する。
- (4) 老化モデルとして CHIP ノックアウトメダカを作成する。
- (5) 給餌によるカロリー量変化がメダカ寿命に与える影響を調べる。

4. 研究成果

(1) p16 ホモログのクローニング

CDKN2A(p16^{INK})は老化細胞特異的に発現する老化細胞マーカーである。メダカにおいてこの遺伝子と相同な配列をゲノムデータベースより探索し、得られた周辺配列をもとにメダカ 8 日目胚 cDNA より CDKN2A のホモログである CDKN2a/b をクローニングした。得られた遺伝子は 135 アミノ酸をコードしていた。

(2) 周辺配列を用いた遺伝子導入メダカの作出

得られた cDNA 配列をもとにゲノム上の p16^{INK} 遺伝子位置を決定し、その周辺 6kb ほどを PCR により増幅し、p16^{INK} 遺伝子の exon1 部分を蛍光タンパク質遺伝子 Venus および polyA 配列に置換したベクター(図 1)を作出した。得られたベクターを phiC31 インテグレースによる遺伝子導入法によりメダカゲノムに挿入した。

得られた遺伝子導入メダカの初期胚を観察したところ、一部の細胞で蛍光が見られた(図 2)

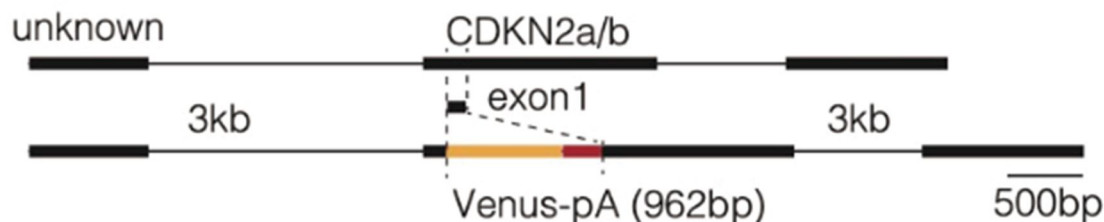


図 1

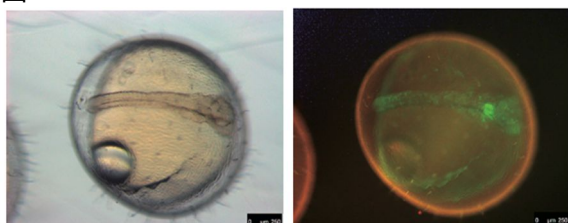


図 2

(3) 薬剤誘導性アポトーシスメダカの作出

(2) で作出したベクターをもとに、薬剤依存的にアポトーシスを誘導できる分子である Fv-hCasp8 あるいは NfsB を Venus の遺伝子下流に挿入したベクターを作出した。(2) と同様にメダカゲノムに導入した。

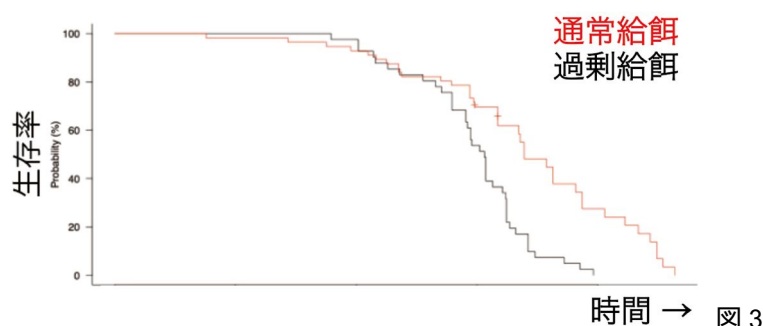
(4) 老化モデルメダカの作成

ショウジョウバエにおいて E3 ライゲース CHIP のノックアウトはショウジョウバエ寿命を減少させる。メダカにおいて同様のモデルを作成するため、メダカ CHIP 遺伝子を CRISPR/Cas9 法によりノックアウトした。

(5) メダカを用いた寿命解析の条件検討

まず、メダカを餌としてブラインシュリンプを用いた通常飼育条件と、ブラインシュリンプに加えて 1 日 5 回の粉餌給餌を行う条件で飼育を行った。

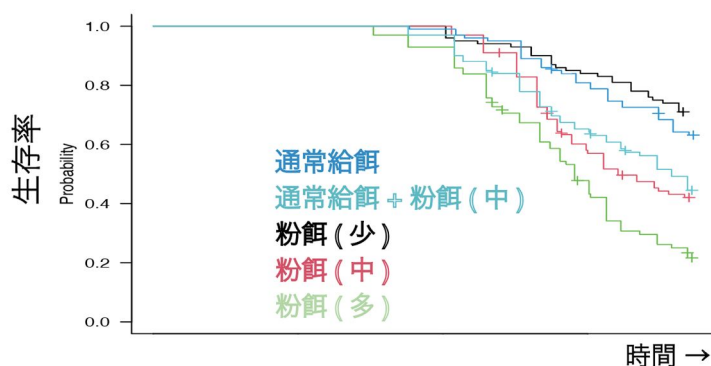
その結果、予想通り過剰な給餌により早期にメダカが死亡し、寿命の低下が見られ、通常給餌条件では相対的な寿命の延長が確認された(図 3)。一方で、一日 5 回の給餌は通常給餌条件よりも大過剰のカロリー摂取となり、寿命低下がカロリー摂取による疾患による可能性を排除できないため、次に給餌量を減らしてさらなる解析を行った。



ブラインシュリンプを与える通常の給餌条件に加えて、通常の粉餌給餌の条件(粉餌(中))、およびそれよりも少ない、あるいは多い条件(粉餌(少、多))、およびブラインシュリンプ+粉餌(中)条件を加えてメダカを飼育し生存率を測定した。

現在は実験の途中であるが、これまでに通常給餌条件と比較して、通常給餌+(中)では早くメダカが死亡していることがわかった。また、粉餌の条件では最も多く給餌されたグループが最も早くメダカが死亡している一方で、最も少なく給餌されたグループでは通常量の粉餌(中)と比較して死亡するメダカの数が少なかった。すなわち、給餌量に反比例してメダカの寿命が延長されていることがわかった。

興味深いことに粉餌(少)条件では通常のブラインシュリンプ給餌と比較して、さらに生存率が高い傾向が見られる。現在まででは有意差はついていないが、今後観察を継続することで寿命が延長されているかを明らかにしたい。



本研究により、メダカの老化・寿命を解析するためのツール、実験条件の一部が確立された。今後は、老化細胞生成とメダカ寿命の関係を明らかにするとともに、寿命に変化を与える複数の給餌条件において、老化のプロセスがどのように進行するのかを多点のサンプルを用いた NGS 解析によって明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ninagawa Satoshi, Tada Seiichiro, Okumura Masaki, Inoguchi Kenta, Kinoshita Misaki, Kanemura Shingo, Imami Koshi, Umezawa Hajime, Ishikawa Tokiro, Mackin Robert B, Torii Seiji, Ishihama Yasushi, Inaba Kenji, Anazawa Takayuki, Nagamine Takahiko, Mori Kazutoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Antipsychotic olanzapine-induced misfolding of proinsulin in the endoplasmic reticulum accounts for atypical development of diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 23-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.60970	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
1. 著者名 Koba Hibiki, Jin Shengyu, Imada Nanami, Ishikawa Tokiro, Ninagawa Satoshi, Okada Tetsuya, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Mori Kazutoshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Reinvestigation of Disulfide-bonded Oligomeric Forms of the Unfolded Protein Response Transducer ATF6	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 9~21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19030	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 Jin Byungseok, Ishikawa Tokiro, Taniguchi Mai, Ninagawa Satoshi, Okada Tetsuya, Kagaya Shigehide, Mori Kazutoshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Development of a Rapid <i>in vivo</i> Assay to Evaluate the Efficacy of IRE1-specific Inhibitors of the Unfolded Protein Response Using Medaka Fish	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 23~31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19032	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 George Ginto, Ninagawa Satoshi, Yagi Hirokazu, Saito Taiki, Ishikawa Tokiro, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Imami Koshi, Ishihama Yasushi, Kato Koichi, Okada Tetsuya, Mori Kazutoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 EDEM2 stably disulfide-bonded to TXNDC11 catalyzes the first mannose trimming step in mammalian glycoprotein ERAD	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 pii: e53455.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.53455	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川時郎、山崎鈴花、森和俊
2. 発表標題 IRE1経路とPERK経路/ATF6経路の重複した生理的役割の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------