

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14341

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いたMuRFの発現機構解析と筋萎縮治療薬の探索

研究課題名(英文)Drug screening with murf1 transgenic fish

研究代表者

川原 玄理 (Kawahara, Genri)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40743331

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)：筋特異的E3ユビキチンリガーゼであるMuRF-1の発現をコントロールする薬剤を見つけるため、ゼブラフィッシュmurf1プロモーター領域を明らかにし、その遺伝子配列を組み込んだEGFP発現ベクターを用いて、murf1トランスジェニックゼブラフィッシュを作製することに成功した。これらの個体を野生型と交配し次世代を作製、その個体群から、骨格筋、心筋特異的にEGFPシグナルが観察される個体、つまりEGFPシグナルにより間接的にmurf1の発現が観察される個体が得られた。
これらを用いたmurf1発現制御物質のスクリーニングの結果、ゼブラフィッシュmurf1遺伝子発現を制御する複数の薬剤候補が得られた。

研究成果の概要(英文)：In the upstream of the zebrafish murf1 gene, we identified the promoter region of zebrafish murf1 gene. With microinjection of the DNA construct including the promoter region and EGFP cDNA to zebrafish eggs, we successfully made the transgenic zebrafish (murf1:EGFP) line. RT-PCR confirmed that the murf1 expression corresponded with EGFP expression in the transgenic fish line. In the adult transgenic fish, murf1 corresponding with EGFP were predominantly expressed in skeletal muscle and heart. The transgenic zebrafish line might be excellent tool to evaluate the expression of murf1 under muscle atrophy. Using this transgenic fish, ten drugs were identified that can change murf1-expression from a chemical library. Our findings would be led to good tools and key molecules for treatment of muscle atrophy.

研究分野：病態生理学

キーワード：筋萎縮 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

MuRF1 (Muscle Specific RING-Finger Protein-1) は、コネクチンと結合する筋特異的タンパク質として同定された分子量 40 kDa の RING 型 E3 ユビキチンリガーゼである。骨格筋、心筋で特異的に発現し、筋萎縮時に発現量が促進されることが報告されている。MuRF1 ノックアウトマウスでは、筋萎縮に対して耐性を示すことから、MuRF1 は筋萎縮において主要な役割を担っていると考えられる。

小型魚類であるゼブラフィッシュは様々な疾患研究に優れたモデル動物として現在広く用いられている。ゼブラフィッシュの各組織が透明で観察しやすく、多産であること、その初期発生のスピードの速さが遺伝学的研究の大きな利点となっている。特にゼブラフィッシュは筋疾患モデルとして有用であり、我々もこれまでに様々な筋疾患モデルフィッシュを作製し、解析をおこなってきた。また、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) のモデルフィッシュを用いて薬剤スクリーニングの方法を確立し、DMD モデルフィッシュの表現型を改善するのに有効な薬剤を見いだしている (Kawahara, et al: Proc Natl Acad Sci U S A, 2011)。このように筋組織において、薬物治療効果を簡便に評価する上でも、ゼブラフィッシュは有用なツールである。

2. 研究の目的

本研究課題では、MuRF1 の発現を制御し、筋萎縮シグナルをコントロール可能な分子や薬剤を明らかにすることを目的として、次の 2 つのプロジェクト (1) ゼブラフィッシュを用いた murf1 プロモーター領域の特定と murf1 トランスジェニックフィッシュの作製 (2) トランスジェニックフィッシュを用いて、murf1 の発現を制御しうる薬物のスクリーニングを遂行した。

3. 研究の方法

(1). murf1 プロモーター領域の特定

murf1 は骨格筋、心筋特異的に強く発現していることがゼブラフィッシュでも示されている。murf1 遺伝子の翻訳開始領域の上流部領域について遺伝子クローニングをおこなない pEGFP-1 ベクターに連結、ゼブラフィッシュ受精卵に注射し、murf1 プロモーターによる EGFP 発現を観察した。骨格筋および心筋特異的な EGFP 発現の有無を確認することによりどの murf1 プロモーター領域が発現に必要なかを調べた。

(2). murf1 トランスジェニックフィッシュの作製

murf1 プロモーター領域 + EGFP のコンストラクトを受精卵に直接注射し、ゼブラフィッシュのゲノム DNA にこのコンストラクトが組み込まれたトランスジェニックゼブラフィッシュを作成した。この murf1 プロモーター領域を組み込んだトランスジェニックフィッシュは murf1 遺伝子の発現に応じて、EGFP シグナルが変化することから、murf1 遺伝子発現を可視化することが可能となる。

EGFP シグナルが筋組織で観察されている個体を第一世代 (F0) として、これらの個体を用いて次世代 (F1) を作成し、骨格筋、心筋特異的な EGFP のシグナルが観察されるかどうか確かめ、トランスジェニックフィッシュの系統を作製した。

(3). murf1 トランスジェニックフィッシュを用いた薬剤スクリーニング

murf1 トランスジェニックフィッシュを用いて、EGFP シグナルを抑制もしくは促進するような、つまり murf1 遺伝子発現を制御する

ことができる薬剤を、市販のケミカルライブラリーからスクリーニングした。ゼブラフィッシュの受精後4日目の胚を薬剤を含む飼育水に入れ飼育後、5日目でEGFP発現を確認する。ゼブラフィッシュの胚は非常に小さいため、96穴プレートでのアッセイ、薬剤処理が可能であり、EGFPシグナルを自動的に検出可能なIn Cell Analyzer (GE Healthcare社)を用いることにより、1,250種類の化合物について、その発現の抑制、促進への効果を検出した。

(4) . スクリーニングによる murf1 遺伝子発現制御薬剤の効果の検証

スクリーニングによる murf1 遺伝子発現制御薬剤の効果を確認するために、野生型ゼブラフィッシュに、薬剤スクリーニングした際に用いた濃度 10 μM となるようにそれぞれの候補薬剤を加え、24時間薬剤処理した。薬剤処理後の個体から、RNA抽出、cDNA合成を行なった。それらを鋳型に用いて定量的PCRを行ない、それらの薬物による murf1 遺伝子発現への影響を解析した。

4 . 研究成果

(1) . murf1 プロモーター領域の特定

murf1 の翻訳開始点の上流部領域について遺伝子クローニングをおこない pEGFP ベクターに連結、ゼブラフィッシュ受精卵に注射し、murf1 プロモーターによるEGFP発現を観察した結果、骨格筋および心筋特異的なEGFP発現の有無を確認したところ、骨格筋および心筋特異的なEGFP発現が確認された。この結果から murf1 プロモーター領域が我々が遺伝子クローニングした murf1 遺伝子翻訳開始点上流部の遺伝子配列に存在することが特定された。

(2) . murf1 トランスジェニックフィッシュの作製

murf1 プロモーター領域 + EGFP のコンストラクトを受精卵に直接注射し、ゼブラフィッシュのゲノムDNAにこのコンストラクトが組み込まれたトランスジェニックゼブラフィッシュを作成した。

murf1 翻訳開始点の上流のPCR産物をpEGFPベクターに組み込み、ゼブラフィッシュの受精卵に注射したところ約50%の個体でEGFPシグナルが筋組織で観察され、これらの個体を第一世代(F0)として飼育し、これらの個体を用いて次世代(F1)を作成し、骨格筋、心筋特異的なEGFPのシグナルが観察されることを確認し、トランスジェニックフィッシュの系統を作製した。この murf1 プロモータートランスジェニックフィッシュは murf1 遺伝子の発現に応じて、EGFPシグナルが変化することから、murf1 遺伝子発現を可視化することが可能となる。

(3) . murf1 トランスジェニックフィッシュを用いた薬剤スクリーニング

murf1 トランスジェニックフィッシュを用いて、市販のケミカルライブラリーから murf1 の発現を変化させる化合物のスクリーニングを行った。ゼブラフィッシュ受精後4日目の胚を、一匹ずつ96穴プレートの各ウェルに入れた。また、ケミカルライブラリーに含まれる1,280種類の化学物質それぞれを含む飼育水の中で(10 μM) 24時間薬剤処理後、EGFPシグナルを自動的に検出可能なIn Cell Analyzer (GE Healthcare社)により、その発現を検出した。その結果、1,280種類の薬剤の中から10種の murf1 発現変化を示すものが検出された。

(4) . スクリーニングによる murf1 遺伝子

発現制御薬剤の効果の検証

スクリーニングにより murf1 遺伝子発現変化が検出された薬剤について、その効果を定量的 PCR によって調べた結果、これらの薬剤処理によって murf1 の遺伝子発現が変化することが確認された。

これらの候補薬剤のさらなる研究により、筋萎縮の予防やそれを伴う疾患の治療薬の開発への結びつく可能性があると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

川原 玄理 (KAWAHARA, Genri)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40743331

(2)研究分担者

林 由起子 (HAYASHI, Yukiko)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号：50238135