

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：32601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04657

研究課題名(和文) 触覚受容に必要な分子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of tactile reception

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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュの運動系をモデルとして、触覚受容に関連する分子を探索し、触覚受容に関わる膜タンパク質を同定した。また、ゼブラフィッシュの運動を定量解析する実験系の構築を行い、人工的な水流の中で泳がせて最大泳動速度を測定するスイムミルを確立した。これを用いて、ゼブラフィッシュの運動特性を解析し、たとえば運動能力に性差がないことや、尾ひれの長さは5ミリの際に運動能力が最大化することなどを見出した。ゼブラフィッシュには実験室で確立された、遺伝的バックグラウンドの異なる系統が存在するが、それらを比較することで、WIKという系統が運動能力が低く、これが親から子に遺伝する形質であることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

物に触れた時に感じる感覚を触覚という。触覚は視覚、聴覚、嗅覚、味覚とならぶ五感の一つとして紀元前から知られるが、どうやって触覚を感じるか、具体的には触覚の受容体やその他の細胞内分子の実体については他の感覚と比べて未解明のことが多く残されている。これを解明する目的でゼブラフィッシュの運動をモデルとした触覚の研究を行い、触覚を感じるのに必要な分子を探索し、触覚を感じるのに必要なタンパク質を同定した。このタンパク質は細胞膜上にあると考えており、この分子の理解から、触覚異常をともなうさまざまな疾患の理解が深まると期待される。また、ゼブラフィッシュの運動を計測し、運動能力が遺伝形質であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Using the motor system of zebrafish as a model, we searched for molecules related to mechanoreception. We identified a membrane protein that is likely involved in mechanoreception. We also intended to construct an experimental system for quantitative analysis of zebrafish swimming and established a swimmill that measures the maximum speed of fish swimming. Using this system, we analyzed the swimming ability of zebrafish and found that there is no gender difference in swimming ability and that the swimming ability is maximized when the length of the tail fin is 5 mm. There are several genetically different zebrafish lines established in laboratories. We compared swimming ability of several lines and revealed that the WIK line is less capable of swimming and this trait is inherited to offspring.

研究分野：脳科学

キーワード： 遺伝学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトは感覚器官を通してさまざまな感覚を受容する。紀元前から五感(視覚、聴覚、嗅覚、味覚、触覚)が知られているが、現在ではこれに加えて内臓感覚、平衡感覚なども確立している。ヒトには備わっていないが、赤外線が見えたり、超音波が聞こえたり、地磁気を感じできたりする動物もいて、もちあわせている感覚は動物によって違うとされる。ヒトで触覚に近い皮膚感覚としては圧覚、痛覚、温度感覚なども知られている。ここにあげたすべての感覚について一次感覚ニューロンが存在して、それぞれが受容体を発現するとされるが、触覚については一次感覚ニューロンはよく分かっている一方で、受容体や関連分子には不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 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、運動を解析する実験系を構築する。
(2) ゼブラフィッシュの運動をアッセイ系とした遺伝学的手法を取り入れ、触覚を感じるのに必要な分子の同定を目指す。また、同定した分子について、培養細胞を用いた *in vitro* 解析およびゼブラフィッシュを用いた *in vivo* 解析の両面から研究し、触覚の分子基盤を解明する。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュの運動を評価する目的でスイムミルという、陸上動物のトレッドミルの水中生物版を構築し、ゼブラフィッシュの感覚運動や運動能力の基本特性を把握する。
(2) エチルニトロソウレアを変異原とした順遺伝学スクリーニングを行い、変異導入から3世代目の個体に触刺激を与えて感覚運動を観察することで、触刺激へに反応に異常がある個体を同定する。このような変異が同定されたら、遠系統との交配で変異体の責任遺伝子をマッピングして責任領域を狭め、最終的には候補遺伝子をクローニングして変異を同定する。責任遺伝子が同定されたら、*in situ* hybridization 法で当該の責任遺伝子の mRNA を染色し、発現領域を調べる。変異体は感覚受容を担う Rohon-Beard ニューロンなどの一次感覚ニューロンに異常があると推察されるので、Rohon-Beard ニューロンに注目して、神経細胞の形態染色を行い、また、電気生理解析も行い、異常を詳細に記述する、さらに HEK293 細胞を用いた *in vitro* 実験系を使い、責任遺伝子の機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュの運動を定量評価するスイムミルというシステムを構築した。そもそも動物の運動能力には個体差があり、それはヒトでも同様である。またヒトの場合、アスリート親子のように運動能力が親から子に遺伝することを想起させる例が多数ある。運動能力のよしあしを議論するにあたり、後天的な要素であるトレーニングが重要なことは明らかだが、遺伝的背景の違いが運動能力の差をもたらしていることも経験則から間違いないとされる。ゼブラフィッシュを人工的な水流で泳がせるスイムミルという手法でゼブラフィッシュの運動能力を定量評価することで、まずゼブラフィッシュのオスとメスでは運動能力に差がないことを見出した。ゼブラフィッシュの尾ひれは泳ぎにおける推進力を作り出すのに必要だが、その長さは 5 mm 程度から 20 mm 超と幅があり、尾ひれを少しずつ切って短くしてスイムミルで泳がせる実験を繰り返し行い、泳ぎにおける尾ひれの長さの有効性を確認すると、尾ひれは短かすぎても長すぎても泳ぎが遅くなり、ベストの運動パフォーマンスを発揮するための尾ひれの長さは 5 mm であることが分かった。ゼブラフィッシュは実験室では 28.5 度で定温飼育するが、自然界では 15 度から 30 度の水温環境で生育している。さまざまな温度における運動能力として泳ぎの最大速度を測定すると、16 度から 30 度では正常と同じレベルの運動パフォーマンスを発揮できることが分かった。一方で 14 度以下の低水温や 33 度以上の高水温では運動能力が顕著に低下することが分かった。これらはゼブラフィッシュの自然界での生育環境と相関があり、ゼブラフィッシュは熱帯魚として一定の水温幅に適応できることが分かった。ゼブラフィッシュは研究用の実験動物としても確立されており、世界の各施設でのブリーディングにより、AB, TU, TL, WIK などの遺伝的に異なる「系統」が確立されてきた。これらのオリジナルを入手してそれぞれの泳動能力を測定すると、AB や TU という系統は運動能力が高いのに対し、WIK という系統は AB や TU と尾ひれの長さは同じであっても運動能力が顕著に低いことが分かった、さらにこれらの系統からそれぞれ次世代を作ると、親の世代の運動能力のよしあしはそのまま遺伝し、やはり WIK は運動能力が低いことが再現された。WIK を TU と交配して次世代を得て運動能力を測定すると、それらはいずれも TU と同程度の高い運動パフォーマンスを発揮したことから、WIK の運動能力の低さはある種の遺伝形質であり、劣性的な形質であることが分かった。これは経験的に知られている、いわゆるヒトの運動神経が遺伝することを定量的に結論付けた報告となるが、これは決して運動能力の限界が遺伝的に決まっていると主張するものではない。むしろ後天的なトレーニングが重要であることを訴えるものである。ゼブラフィッシュに運動トレーニングを課すと運動能力が向上するという報告もあり、本研究結果と合わせると、動物の運動能力のスタート地点に個人差があるとしても、トレーニングを行えば、誰でも運動能力を向上させることができ、これはヒトでいうと、日々のトレーニングを繰り返せばもともと運動の得意ではない人でも、スポーツで活躍できるようになることをあらわしていると言える。この研究成果はサイエンティフィック・リポーツ誌に掲載された。

感覚受容から運動出力までの動物の運動における神経プロセスにおいて、グリシン受容体の動態が重要であることを見出した。動物は環境に応じて行動を変化させる。実際、魚は静かなところでは音に非常に敏感で、バシヤという水音を聞くと音から遠ざかる方向に逃げるが、雨が降るなど周りがうるさく状況だと、水音に反応しなくなることが知られている。ゼブラフィッシュに雨の音を聞かせ、脳神経にどのような変化が起こることで、この行動変化が起こるかを研究した。ゼブラフィッシュに雨の音を聞かせると、魚類の後脳にあり逃避に関係するマウスナー細胞という巨大の神経細胞で CaMKII というタンパク質リン酸化酵素が活性化し、これがゲフィリンという抑制性シナプスの足場タンパク質にリン酸を結合させることが分かった。リン酸化されたゲフィリンはグリシン受容体という抑制性シナプス伝達の受容体との親和性が高まり、抑制性シナプスの後膜領域にグリシン受容体を集合させ、これによりマウスナー細胞への抑制性伝達が強化され、マウスナー細胞がはたらかなくなり、ゼブラフィッシュは水音を聞いても逃げなくなることが分かった。この結果から、魚が雨の音を聞くと神経細胞内でグリシン受容体の集合が起こり、行動が変化する全容が解明された。川や海で生活する魚は常に上空の鳥に狙われている。鳥は水にダイブして一瞬のうちに魚を捕食するが、その際、鳥のくちばしが到達する前に魚はバシヤという水音を聞くことになる。魚は鳥の襲撃を水音で事前察知するために常々音に敏感になっており、水音を聞くとすぐに逃げると考えられる。一方、雨が降ると雨粒は水面に無数の水紋を作り、上空の鳥からは魚が見えなくなるので、魚を襲撃しなくなる。そこで魚は雨音を聞くと CaMKII を働かせてゲフィリンにリン酸を結合させ、グリシン受容体を集合させることにより、水音を聞いてもいちいち逃げないようにしていると考えられる。これは動物が天候の変化に適応して行動を変化させる分子メカニズムと言える。沖縄には「あみじけ」という、音を立てて魚を網の方向に追い込んで捕獲する伝統的な追い込み漁があり、あみじけは天候に左右されるが、本研究はその経験則を解明したものである。この研究成果は他グループとの共同研究として米国神経科学会誌 *ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス* に掲載された。

(2) ゼブラフィッシュが触刺激に対する運動応答を獲得するのは受精から1日後であり、受精2日になると、逃避運動をするようになる。これは感覚受容から運動出力までの機能的神経回路が形成されていることをあらわす。エチルニトロソウレアで処理することで変異を導入したゼブラフィッシュを交配して3世代目で触刺激を与えて本来見られるはずの逃避運動がみられないような変異体を単離するスクリーニングを行った。得られた変異体のキャリアはそれぞれ遠系統のゼブラフィッシュと交配して2世代後のホモ変異体を集めて染色体上に散在する 214 のマイクロサテライトマーカーとのリンクを調べることで染色体上の責任領域を狭めるマッピングを行った。責任領域を狭めることで候補遺伝子を絞ると、それらをクローニングして変異の有無を調べることで、原因遺伝子の特定を進めた。原因遺伝子が特定されたら、その遺伝子の cRNA をジゴキシン標識したプローブを用いた *in situ hybridization* を行うことで当該遺伝子を発現する細胞を特定した。感覚受容に異常のあるものに注目しているため、原因遺伝子は一次感覚ニューロンである Rohon-Beard ニューロンに発現することが予想されたが、実際に全てのケースでそれが確認されたことから、本研究で目的のスクリーニングができていたことが確認された。得られた変異体の1つはマッピングから第5番染色体長腕に責任領域があることが分かり、候補遺伝子のクローニングから膜タンパク質をコードする遺伝子の変異があることが分かり、その遺伝子の発現は Rohon-Beard ニューロンに確認された。カルシウム指示タンパク質 GCaMP をこの変異体の Rohon-Beard ニューロンに発現させて神経活動を蛍光で可視化できるようにして変異体に触刺激を与えると、本来は見られるはずの蛍光上昇は見られず、Rohon-Beard ニューロンのレベルで触刺激応答ができていないことが明らかになった。さらに Rohon-Beard ニューロンをパッチクランプして電気生理を行うと、変異体の Rohon-Beard ニューロンは触刺激によって発生するはずの活動電位が発生しない、つまり触刺激の受容ができていないことが分かった。これは本研究の目的とする感覚受容に必要な分子であり、本研究の目的は達成されたと言える。

他にも触刺激への応答に異常のあるゼブラフィッシュ変異体としてインテグリンベータサブユニット1の変異体を同定した。細胞骨格の重合・脱重合を制御する細胞内シグナル伝達に関わる分子で低分子量 GTP 結合タンパク質である Rap1 はインテグリンを活性化することで、細胞と細胞外マトリックスの接着を強化するとともに、カルシウム依存性細胞接着分子カドヘリンを介した細胞同士の接着を促進することが知られている。インテグリンベータサブユニット1を欠損するゼブラフィッシュ変異体を用いた解析から、Rap1 がインテグリンを介した細胞接着を促進することで、血管芽細胞と体節細胞の接着を強化し、これが血管芽細胞における Notch シグナルを活性化し、その結果として造血幹細胞の発生分化を正に制御していることが分かった。この研究成果は他グループとの共同研究として *ディベロップメンタル・セル* に掲載された。

また、もやもや病の遺伝的リスク要因として知られるミステリンという巨大タンパク質が機能しないゼブラフィッシュの解析から、ミステリンが細胞内の脂肪貯蔵部位である脂肪滴に局在して、脂肪分解酵素から脂肪滴を保護し、細胞内の脂肪を蓄積させることに寄与することが分かった。脂肪は酸素呼吸により燃焼して生体内の重要なエネルギーとして用いられ、脂肪が過剰に蓄積した肥満状態が、動脈硬化や糖尿病を含む種々の生活習慣病を引き起こすことから、もやもや病発病のプロセスについて新しい考察を加えることになった。この研究成果は他グループとの共同研究として *ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー* に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ogino Kazutoyo, Yamada Kenta, Nishioka Tomoki, Oda Yoichi, Kaibuchi Kozo, Hirata Hiromi	4. 巻 39
2. 論文標題 Phosphorylation of Gephyrin in Zebrafish Mauthner Cells Governs Glycine Receptor Clustering and Behavioral Desensitization to Sound	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8988 ~ 8997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1315-19.2019	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 Wakamatsu Yuma, Ogino Kazutoyo, Hirata Hiromi	4. 巻 9
2. 論文標題 Swimming capability of zebrafish is governed by water temperature, caudal fin length and genetic background	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-019-52592-w	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 Rho Seung-Sik, Kobayashi Isao, Oguri-Nakamura Eri, Ando Koji, Fujiwara Masakazu, Kamimura Naomi, Hirata Hiromi, Iida Atsuo, Iwai Yoshiko, Mochizuki Naoki, Fukuhara Shigetomo	4. 巻 49
2. 論文標題 Rap1b Promotes Notch-Signal-Mediated Hematopoietic Stem Cell Development by Enhancing Integrin-Mediated Cell Adhesion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 681 ~ 696.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2019.03.023	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 Sugihara Munechika, Morito Daisuke, Ainuki Shiori, Hirano Yoshinobu, Ogino Kazutoyo, Kitamura Akira, Hirata Hiromi, Nagata Kazuhiro	4. 巻 218
2. 論文標題 The AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin stabilizes cytoplasmic lipid droplets	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 949 ~ 960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201712120	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 Frints Suzanna G.M. et al	4. 巻 40
2. 論文標題 Deleterious de novo variants of X linked ZC4H2 in females cause a variable phenotype with neurogenic arthrogyrosis multiplex congenita	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 2270 ~ 2285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.23841	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 Ogino Kazutoyo, Hirata Hiromi	4. 巻 9
2. 論文標題 Defects of the Glycinergic Synapse in Zebrafish	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2016.00050	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 Iida Atsuo, Wang Zi, Hirata Hiromi, Sehara-Fujisawa Atsuko	4. 巻 23
2. 論文標題 Integrin 1 activity is required for cardiovascular formation in zebrafish	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 938 ~ 951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12641	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 Schaefer Natascha, Zheng Fang, van Brederode Johannes, Berger Alexandra, Leacock Sophie, Hirata Hiromi, Paige Christopher J., Harvey Robert J., Alzheimer Christian, Villmann Carmen	4. 巻 11
2. 論文標題 Functional Consequences of the Postnatal Switch From Neonatal to Mutant Adult Glycine Receptor 1 Subunits in the Shaky Mouse Model of Startle Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2018.00167	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 Nakahata Yoshihisa, Eto Kei, Murakoshi Hideji, Watanabe Miho, Kuriu Toshihiko, Hirata Hiromi, Moorhouse Andrew J., Ishibashi Hitoshi, Nabekura Junichi	4. 巻 4
2. 論文標題 Activation-Dependent Rapid Postsynaptic Clustering of Glycine Receptors in Mature Spinal Cord Neurons	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0194-16.2017	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5件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 平田普三
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた骨格筋の形成・維持の研究およびその破綻による疾患
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田普三
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたカルシウム動態制御と筋疾患の研究
3. 学会等名 第4回日本筋学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田普三
2. 発表標題 生体内可視化によるゼブラフィッシュの筋の定量化
3. 学会等名 第6回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田普三
2. 発表標題 グリシン作動性シナプスの可塑性による動物の環境適応
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平田普三
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ成魚のてんかん発作
3. 学会等名 第3回ゼブラフィッシュ創薬研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hirata H and Iida A (Ed)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 315
3. 書名 Zebrafish, Medaka, and Other Small Fishes: New Model Animals in Biology, Medicine, and Beyond	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----