

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06882

研究課題名(和文) 自発的小胞放出を欠損するゼブラフィッシュを用いたシナプス伝達メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of synaptic transmission using zebrafish mutants

研究代表者

小野 富三人 (ONO, FUMIHITO)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：70743996

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)：本研究では小型の魚類であるゼブラフィッシュで運動神経が筋肉に信号を伝達するつなぎ目である神経筋接合部を用いてそのメカニズムを研究した。ゼブラフィッシュには多数の突然変異体が存在しており、それらは運動にさまざまな異常をきたすが、今回テーマとしたのはそのうちでシナプスでの情報伝達が全く起こらずに体が完全に麻痺している個体であり、その体内でどのような遺伝子変化が起きているかを調べ、その遺伝子の働きを解析した。その過程で、筋肉の中で遅筋だけが神経の入力を受ける動物を世界で初めて作成し、この個体では運動神経が繋ぎ変わる事を明らかにした。この結果は国際誌Science Advancesに発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人間においても運動は魚類と同様のメカニズムで起こるが、近年人口の高齢化につれて健康のための運動の重要性が強調されている。速筋と遅筋は加齢や低重力、長期臥床など様々な条件によってその比率が変わることが報告されており、今回我々が研究成果に基づいて報告した、運動神経の繋ぎかえによる遅筋から速筋への転換は、さらにそのメカニズムの解明を進めることにより、純粋に神経科学の進歩だけでなく、上記の社会的な問題の解決にも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We use zebrafish as a model system to study synapses. The synapse we study is the neuromuscular junction (NMJ) between motor neuron axons and skeletal muscle cells, among others. Zebrafish offers a plethora of genetic mutants, some of which harbor mutations in the genes functioning in the synapse. In this project, we focused on one mutant whose NMJ lacks receptors for the neurotransmitter. We isolated genes that are increased or decreased in this mutant, and analyzed their functions. In the process, we established a mutant in which motor neurons innervate only slow muscles. Over development, this mutant switched its motor neuron connection and some of the slow muscles converted to fast muscles, making quick movements possible. We published the results in Science Advances.

研究分野：生理学、神経科学

キーワード：シナプス 筋肉 ゼブラフィッシュ

## 1．研究開始当初の背景

シナプス伝達の本質は、神経軸索終末から放出されたシナプス小胞に含まれる神経伝達物質がポスト側の受容体に結合して情報が伝わることであり、したがってシナプス小胞放出のメカニズムは神経機能の根幹をなす。本研究は、医学生物学研究の分野で広く用いられている小型魚類ゼブラフィッシュの神経筋接合部をモデルとして、シナプス小胞放出のメカニズムの解明を目指した。シナプス小胞放出の様式は大きく分けて、プレシナプス側(神経筋接合部では運動神経)の活動電位に伴って起こるもの(活動電位依存性)と、それとは無関係に自発的かつランダムに起こるもの(自発性)がある。ポストシナプス側の骨格筋細胞からシナプス電流を測定すると、正常個体では自発的な小胞放出と活動電位依存性小胞放出に伴って特徴的な電流が記録される。シナプスでの情報伝達で重要な役割を果たすシナプス小胞の放出機構は、電気生理学的な解析から始まり、分子生物学の時代になると各種の制御分子が同定され、1970年にKatzら、2013年にSüdhofらがそれぞれノーベル医学生理学賞を受賞している。上記活動電位依存性及び自発的な小胞放出の両者を制御する分子マシーンは世界中で研究が進められたが、未だに多くの謎が残っていた。

## 2．研究の目的

自発的なシナプス小胞の放出に関してはその意義やメカニズムについて論争が続いている状況の中、本研究の研究代表者は、2017年に発表した論文で、活動電位依存性シナプス小胞放出は保たれたまま自発的シナプス小胞放出がほぼ消失した遺伝子改変ゼブラフィッシュを報告した。この実験系を利用することでシナプス小胞の Spontaneous な放出のメカニズムの解明に向けて重要な寄与が可能であると考え、自発的な放出のメカニズムについて解析を進めることを目的とした。

## 3．研究の方法

(1) 活動電位依存性シナプス小胞の放出は保たれたまま自発的シナプス小胞放出がほぼ消失した遺伝子改変ゼブラフィッシュを用いて、それと正常な個体と比較することで遺伝子の変化を調べた。全身から、自発的シナプス小胞欠損個体で特異的に増加もしくは減少していると考えられた遺伝子を単離した。メッセンジャーRNAは全身から得られたものなので、これらの候補遺伝子のうち、運動神経もしくは骨格筋細胞で発現しているものを、ウェブ上のデータベースと実際の遺伝子発現を調べて選別した。このようにして得られた遺伝子候補のうち3個について解析を進めた。

(2) 自発的なシナプス小胞の放出のメカニズムを生理学的に解析するため、外来遺伝子を組み込んだゼブラフィッシュを作成した。この個体ではシナプス小胞内部に組み込まれた外来タンパク質のために、自発的に放出された小胞をリアルタイムで観察すること、及びその累積を時間的に解析することが可能となる。このように光学的方法と従来の電気生理学的解析を組み合わせることでシナプス小胞放出のメカニズムを解析した。

## 4．研究成果

(1) 遺伝子改変ゼブラフィッシュ個体で発現量が増加していた遺伝子Aについて、ノックアウト個体を作成して解析したところ生理的機能に特に大きな変化はなかった。ゼブラフィッシュのゲノム上で解析したところ、哺乳類ではAそのものは存在せず類似の遺伝子が1コピーしか

存在しないが、遺伝子 A はゼブラフィッシュでは 10 個以上の類似の遺伝子が増幅して存在しており、進化の上でなんらかの理由で増幅したと思われ、ノックアウトが顕著なフェノタイプを示さないのはこれらの類似遺伝子が機能を補うことによることが示唆された。発現を逆に増幅することで何らかの変化が起こることも期待されるため、ゼブラフィッシュ内で強制発現するための DNA クローンを作成して、トランスジェニック動物を作成中であり、結果は今後論文にまとめて発表する。

(2) 遺伝子 B については他種での文献上、筋肉と神経細胞での発現が考えられたため、ゼブラフィッシュのゲノム上に蛍光タンパク質 GFP (Green Fluorescent Protein) をノックインした個体を作成したところ、やはり神経系と骨格筋で GFP の発現が認められた。遺伝子 B についてもノックアウトを作成した。今後その個体を正常個体と比較することで遺伝子の生理的機能の解析を進めていく。

(3) 遺伝子 C については RNAseq 上は変異体では mRNA の量の変化が認められたが、遺伝子発現量を計測する別の方法、digital PCR を用いて比較したところ差は認められずそれ以上の解析は行わないこととした。

(4) 上記方法(2)で述べた通り、シナプス小胞の放出の解析を目的として新規のプロープを用いた系を立ち上げ、自発的に放出されるシナプス小胞の性質の解析を進めた。その結果、シナプス小胞のうちすでに膜表面に接近しており活動電位があればすぐにでも放出が可能である小胞が自発的シナプス放出を担っており、しかもこれらの小胞は二つの放出モードを持ち、それぞれのモードに関わる分子も異なっていることを同定した。以上の発見をまとめた論文を執筆し、現在発表準備中である。

(5) 同じゼブラフィッシュの神経筋肉接合部を用いた突然変異体の解析の過程で、筋肉の中で遅筋だけが神経の入力を受ける動物を世界で初めて作成し、この個体では運動神経が繋ぎ変わる事を明らかにした。この結果は国際誌 Science Advances に発表した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Buntaro Zempo, Yasuhiro Yamamoto, Tory Williams, Fumihito Ono	4. 巻 6
2. 論文標題 Synaptic Silencing of Fast Muscle Is Compensated by Rewired Innervation of Slow Muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eax8382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aax8382	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 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Buntaro Zempo, Yasuhiro Yamamoto, Tory Williams, Fumihito Ono
2. 発表標題 速筋シナプスの機能喪失から示唆された遅筋による速筋機能の補償
3. 学会等名 日本生理学会（国際学会）
4. 発表年 2020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
研究協力者	大黒 恵理子 (DAIKOKU ERIKO) (60268191)	大阪医科大学・医学部・助教  (34401)	

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
---------	---------