

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(A)
 研究期間： 2008 ～ 2009
 課題番号： 20680023
 研究課題名（和文） 運動・行動異常を示すゼブラフィッシュ変異体の単離と解析、またヒト
 関連疾患への応用
 研究課題名（英文） Identification and characterization of zebrafish mutants defective
 in locomotion/behavior and application to associated human diseases

研究代表者
 平田 普三 (Hiromi Hirata)
 名古屋大学・大学院理学研究科・助教
 研究者番号： 60402450

研究成果の概要（和文）：運動・行動に異常のあるゼブラフィッシュ変異体を単離・解析し、8
 系統の変異体について責任遺伝子を同定し、運動異常のメカニズムを解明した。変異体 310 は
 その一例で、GPI アンカータンパクの合成酵素である PIG-U に変異があり、GPI アンカータ
 ンパクを正常に合成できず、電位依存性ナトリウムチャネルの膜表出に異常があり、活動電位
 を発生できないことが分かった。その結果、ゼブラフィッシュは一次感覚ニューロンが機能し
 ないため、逃避運動をできないことが理解された。該当遺伝子はヒトの運動障害の責任部位の
 近傍にあり、ヒト疾患の新しい候補遺伝子として解析を続けている。

研究成果の概要（英文）：I identified and analyzed eight zebrafish mutants, which have
 defects in locomotion and behavior. For instance, mutant mi310 harbored a point mutation
 in PIG-U gene, which is necessary for biogenesis of GPI-anchored proteins. In mutants,
 GPI-anchored proteins were not generated and surface expression of voltage-gated sodium
 channels was perturbed, leading to loss of action potentials. As a consequence, mutant
 zebrafish did not show escape behavior due to hypofunction of primary sensory neurons.
 The corresponding gene in human is a good candidate for a responsible gene for a human
 motor disorder.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2009 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
年度			
年度			
年度			
総計	20,000,000	6,000,000	26,000,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学 ・ 実験動物学

キーワード：ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景
 運動や行動に異常のある変異体を単離する
 スクリーニングはこれまでハエや線虫を用

いて行われ、神経や筋についての多くの知見
 をもたらしえてきた。しかし、これらの動物で
 は電気生理学的解析は可能ではあるが容易

ではなく、また神経系の構造が脊椎動物のものとは異なっているため、得られた知見が脊椎動物に当てはまらないこともあった。一方、哺乳動物を用いた運動・行動の研究で神経や筋の生理的理解は進んだが、哺乳動物では変異体スクリーニングは施設やコストの問題から困難だった。熱帯魚として親しまれているゼブラフィッシュは胚が透明で発生が早く、研究室レベルでの変異体スクリーニングが確立した脊椎動物であることから、これまで主に発生学の分野でモデル動物として使われてきた。また、発生初期から成魚までのあらゆるステージで電気生理学的解析が可能なことから、近年は神経科学の分野でも注目されている。申請者はゼブラフィッシュを研究材料に使うことで上記の問題点を解決し、運動や行動に異常のある変異体を解析し、責任遺伝子を同定できると考えて本研究を開始した。

2. 研究の目的

1996年に報告されたゼブラフィッシュの変異体スクリーニングでも稚魚の行動に異常のある変異体が単離され、現在解析されている。研究代表者は受精後1~2日胚でスクリーニングを行い、受精後1~2日に運動異常を示すものを対象とした。実際に過去のスクリーニングでは単離できなかった新規のものが多くあり、比較的少数の細胞から成るシンプルな機能回路を理解するのに役立つと期待される。神経や筋の異常によるヒトの運動障害は根本的治療法がない難病であり、家族性のもも多い。これまでに報告されたゼブラフィッシュ変異体は全てヒトの運動障害のモデル動物となった。これらは単に同じ遺伝子に変異があり類似の運動異常を示すだけでなく、診断基準となる病理症状でもヒトの病態と酷似している。また、薬物を投与したり、アンチセンス鎖を導入したりすることで、正常な運動を回復させることにも成功していることから、ゼブラフィッシュ変異体を疾患モデルとした運動障害の治療実験を行えると期待できる。単離した変異体の責任遺伝子が新規の場合、該当遺伝子は疾患の新しい原因遺伝子である可能性があり、本研究が未解明のヒトの運動障害の原因遺伝子を同定するブレイクスルーになることも期待される。既知の場合は疾患の動物モデルの確立に寄与できる。また、研究代表者は電気生理を導入することで運動・行動を解析する実験系を確立してきた。本研究から運動障害の疾患モデルが作製できることは明らかで、さらに運動障害の新しい原因遺伝子の探索にも有効であると期待される。

3. 研究の方法

(1) 運動・行動異常を示す変異体には神経の異

常によるものと筋の異常によるものがあるが、電気生理学的手法で筋電位を測定することにより、それらを区別する実験系を確立した。受精後48時間のゼブラフィッシュ胚の皮膚をはがして、筋にパッチクランプを行い、膜電位を測定したまま、接触刺激を与えて逃避行動を誘発すると、筋に異常があり神経系が正常な胚では神経から筋への出力は正常なので、膜電位変化では持続する正常な脱分極パターンが得られる一方、神経に異常のある胚では神経系から筋へのアウトプットが乱れ、異常な膜電位変化が観察される。この方法で全ての変異体を神経の異常と筋の異常に分類できる。

(2) 変異体の責任遺伝子を同定する。ゼブラフィッシュには染色体が25本あるが、各染色体で200以上のSSLPが利用できる。変異体を2000個体用意してリンクするSSLPを調べると、変異の責任領域は約50kbに絞られる。その領域に存在するcDNAは多くても3つであり、それらをクローニングすれば変異を同定できる。

(3) 遺伝子の変異による運動・行動異常のメカニズムを明らかにする。変異体が神経の異常である場合、神経細胞にパッチクランプを行い、活動電位やシナプス伝達などを解析して異常のあるステップを同定する。変異体が筋の異常である場合、カルシウムイメージングなどで異常のあるステップを同定する。また、1000フレームの画像を1秒間に記録できる高速CCDカメラでサカナの運動を撮影し、刺激から動き始めるまでの時間、尻尾をふる速さ、角度などを詳細に解析し、神経や筋の機能の異常と関連づける。これにより、遺伝子の変異から運動・行動の異常の間で、どの細胞にどんな機能異常があるかを明らかにすることができる。

(4) 変異体を運動障害の疾患モデルとして提供する。これまでに同定した変異体全てで変異体の表現型はヒトの運動障害の症状と一致したことから、ゼブラフィッシュ変異体はヒト疾患のモデルになると言える。遺伝子を同定したゼブラフィッシュ変異体はナショナル

バイオリソースプロジェクト (<http://www.shigen.nig.ac.jp/zebra/index.html>) に寄託を進めており、誰でも制約なしで利用できるようになる。マウスで疾患モデルを作ろうとノックアウトマウスを作製しても、呼吸不全などで出生後致死となり運動障害を解析できないケースがあるが、ゼブラフィッシュ変異体なら致死とならず運動機能を解析できる場合が多く、他の動物では作成できなかった疾患モデルをゼブラフィッシュで提供できることは、本研究の強みである。

(5) ヒトの運動障害の原因遺伝子の新しい候補を提唱する。責任遺伝子が新規遺伝子の場合、NCBIのデータベースからヒトの相同遺伝

子を探し、ヒトゲノム上での位置を確認する。その遺伝子座にヒトの運動障害の責任領域がマップされているかを人の運動障害に関するデータベースで調べる。そこに何らかの遺伝性運動障害・行動障害の責任領域がある場合、その疾患を研究している臨床グループに連絡をとり、共同研究として候補遺伝子のシーケンスをお願いする。変異が同定できれば、ヒト疾患の新しい原因遺伝子として発表できる。もちろん、該当するゼブラフィッシュ変異体はその疾患のモデル動物としてナショナルバイオリソースから誰でも利用できるようにする。疾患モデルを作製してヒト疾患に関連づけるという本研究の新しいアプローチは運動障害や行動異常の新しい原因遺伝子を特定するブレイクスルーになると期待される。

4. 研究成果

(1) 電気生理学的手法で変異体の泳動時の筋電位を測定することにより、運動・行動異常を示す変異体を神経の異常によるものと筋の異常によるものに分類した。

(2) マッピングを行い、変異体の責任遺伝子を同定した。例えば、変異体 310 番では GPI アンカータンパクの合成酵素である PIG-U に変異を同定した。また、変異体 130 番では電位依存性ナトリウムチャンネルである Nav1.6a に変異を同定した。

(3) 変異体 310 番と 130 番はどちらも触刺激を与えても逃避運動をしない、表現型が似た変異体であるが、一次感覚ニューロンである Rohon-Beard ニューロンをパッチクランプで解析すると、ナトリウム電流が著しく減少していることが分かった。その結果、活動電位が発生しないことが明らかになった。その一方で、触刺激以外の側線刺激や刺激物刺激に対しては逃避運動が見られ、主な異常部位が一次感覚ニューロンであることが確かめられた。変異体 310 番では分散培養した Rohon-Beard ニューロンで電位依存性ナトリウムチャンネルの膜表出に異常が見られた。このことは GPI アンカータンパクの生合成が GPI アンカータンパクでない電位依存性ナトリウムチャンネルの輸送を制御することを示唆しており、未同定の GPI アンカータンパクがこれに関与することが予想される。関連しそうな GPI アンカータンパクとしてコンタクチンファミリーに属するコンタクチン 1-6 をアンチセンスを用いて発現抑制したが、変異体様の触刺激への応答欠如は見られなかった。また、IgLON ファミリーに属する、Opcml, Neurotrimin, Lsamp1, Negr1, IgLON5 を同様にノックダウンしたが、やはり触刺激に対する応答欠如は再現できなかった。さらに、GPI アンカータンパクである Brevican、GPI アンカー型のスプライシング愛想フォームが報告されている Ncam、ナトリウムチャンネルとの関

係が報告されている GPI アンカータンパクである Prostinin についてもアンチセンスモルフオリノによるノックダウンを行ったが、やはり変異体様の触刺激への応答欠如は見られなかった。

(4) Nav1.6 の異常はヒトで運動障害を起こすことが知られており、ゼブラフィッシュ変異体変異体 130 番は運動障害の疾患モデルとなりうる。この変異系統はナショナルバイオリソースプロジェクトに寄託をする予定である。

(5) PIG-U はヒトの運動障害の責任遺伝子としての報告はないが、この遺伝子のヒトホモログがある染色体領域にはヒトの運動障害 SCAR6 がマップされている。SCAR6 を研究する海外のグループと共同研究を進めており、PIG-U が新規のヒト疾患の責任遺伝子かどうかの解析を続けている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Yuri Nakano, Morihisa Fujita, Kazutoyo Ogino, Taroh Kinoshita, Yoichi Oda and Hiroimi Hirata*. (2010) Biogenesis of GPI-anchored proteins is essential for surface expression of sodium channels in zebrafish Rohon-Beard neurons to respond to mechanosensory stimulation. *Development* 137, 1689-1698 (*Corresponding author)

2. Hiroimi Hirata, Eloisa Carta, Iori Yamanaka, Robert J. Harvey and John Y. Kuwada. (2010) Defective glycinergic transmission in zebrafish motility mutants. *Front. Mol. Neurosci.* 2: Article 26, 1-17.

3. Sean E. Low, Weibin Zhou, Xinling Choong, Louis Saint-Amant, Shawn M. Sprague, Hiroimi Hirata, Wilson W. Cui, Richard I. Hume, and John Y. Kuwada. (2010) Nav1.6a is required for normal activation of motor circuits normally excited by tactile stimulation. *Dev Neurobiol.* In press.

4. Hiroimi Hirata. (2009) Zebrafish muscular disease models towards drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 4: 507-513.

5. Weibin Zhou, Eric James Horstick, Hiroimi Hirata and John Y. Kuwada. (2008) Identification and expression of voltage-gated calcium channel β subunits in zebrafish. *Dev. Dyn.* 237: 3842-3852.

6. Saint-Amant, Shawn M. Sprague, Hiromi Hirata, Qin Li, Wilson W. Cui, Weibin Zhou, Olivier Poudou, Richard I. Hume and John Y. Kuwada. (2008) The zebrafish ennui behavioral mutation disrupts acetylcholine receptor localization and motor axon stability. Dev. Neurobiol. 68: 45-61.

[学会発表] (計 8 件)

1. Hiromi Hirata. GPI transamidase is essential for zebrafish Rohon-Beard neurons to respond to mechanosensory stimulation. 第 32 回日本分子生物学会年会。パシフィコ横浜 (横浜)。2009 年 12 月 9-12 日。

2. 平田普三。発生期のグリシン作動性シナプスの形成。日本発生生物学会秋期シンポジウム。東レ総合研修センター (三島)。2009 年 11 月 27-29 日。

3. 平田普三、中野由梨、小田洋一。感覚ニューロンの障害と細胞死。第 32 回日本神経科学大会。名古屋国際会議場 (名古屋)。2009 年 9 月 16-18 日。

4. Hiromi Hirata, Yuri Nakano and Yoichi Oda. Characterization of zebrafish motility mutant defective in voltage-gated sodium channel. The 36th International Congress of Physiological Sciences. Kyoto, Japan. July 27-August 1, 2009.

5. 平田普三。Rohon-Beard ニューロンの異常による逃避運動の欠如。2009 NIG Zebrafish Meeting. 国立遺伝学研究所 (三島)。2009 年 3 月 18-19 日。

6. Hiromi Hirata, Takaki Watanabe, Jun Hatakeyama, Shawn M. Sprague, Louis Saint-Amant, Ayako Nagashima, Wilson W. Cui, Weibin Zhou and John Y. Kuwada. Zebrafish ryanodine receptor mutants show slow swimming and provide a model of Multi-minicore disease. The 8th International Conference on Zebrafish Development and Genetics. Madison, Wisconsin, USA. June 25-29, 2008.

7. Hiromi Hirata. Zebrafish locomotion and swimming: contribution of fast and slow muscle. MCDB Neuro Group Meeting. University of Michigan, (計 7 件) (計 7 件) (計 7 件) USA. June 30, 2008. (招待講演)。

8. 平田普三。サカナの異常から見えてくる人の病気。第 41 回日本発生生物学会 (ISDB 共催) 市民公開講座「発生生物学から見た生物の世界」。徳島県郷土文化会館 (徳島)。2008 年 5 月 28-31 日 (市民公開講座)。

[図書] (計 3 件)

1. 平田普三。ゼブラフィッシュの運動と行動。細胞工学 2008 年 (Vol. 27) 11 月号、p1125-1130。

2. 平田普三、小橋常彦、小田洋一。硬骨魚類の逃避運動制御メカニズム。実験医学 2008 年 (Vol. 26, No. 12) 増刊号、p1869-1874。

3. 平田普三。ゼブラフィッシュを用いた運動制御の遺伝学的解析。ブレインサイエンス・レビュー 2008、p107-127。

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 普三 (Hiromi Hirata)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号 : 60402450