

## 運動異常を示す変異体の単離と解析

●平田 普三

名古屋大学大学院理学研究科

### <研究の目的と進め方>

ハエや線虫を用いた運動や行動の遺伝学的解析は神経や筋についての多くの知見をもたらしたが、脊椎動物との神経系構造の違いから、脊椎動物への応用ができないこともあった。一方、哺乳動物を用いた神経や筋の生理学的解析は精力的に行なわれたが、変異体スクリーニングはコストの点から困難だった。ゼブラフィッシュは研究室レベルでの変異体スクリーニングが確立された脊椎動物であり、電気生理や可視化技術が可能なこと、運動や行動のゲノムワイドな遺伝学的解析、生理学的解析ができると期待されている。運動や行動を制御する遺伝子を明らかにし、遺伝子から機能回路、さらには運動や行動までを統合的に理解することを目的として、本研究を進める。

研究代表者はゼブラフィッシュ胚をピンセットで1個体ずつついで応答を観察することにより、逃避運動に異常のある変異体の単離をはじめた。この時、発生異常を伴うものを除くことにより、見た目には正常であるが、運動機能（すなわち神経や筋の機能）に異常のある変異体を単離できると期待される。単離できる変異体には筋の異常によるものと神経の異常によるものがあると予想されるが、運動時の筋電位変化を測定するという電気生理的手法を用いて神経系からの出力が正常か異常かを判断することにより、全ての変異体を神経異常と筋異常に分類できる。並行して変異のマッピングを行って変異の責任領域を狭め、最終的に候補遺伝子のcDNAをクローニングして塩基配列を決定することで変異を同定する。責任遺伝子を同定したら、その発現をin situ hybridizationで調べ、gain of function, loss of functionにより確認する。また、パッチクランプやカルシウムイメージングなどを用いて詳細な生理解析を行う。研究代表者はこれまでにイオンチャネルやイオンポンプ、また神経伝達物質の受容体やトランスポーターの変異を同定し、それぞれ運動異常のメカニズムを解明してきた。これらの変異体は全て運動障害や行動異常を主症状とするヒトの疾患のモデル動物になりうる。中には運動・行動異常の治療実験に使える疾患モデルも得られるだろうと期待している。

### <2007年度の研究の当初計画>

6つの変異体について同時に解析を進め、変異をもつ個体を遠系統に交配し、マッピングを進める。ゼブラフィッシュのゲノム情報は2年以内に完成すると言われているが、すでに大部分が利用可能である。変異体の責任遺伝子同定は早ければ2ヶ月、長くても半年でできる。遺伝的マッピングと同時に、表現型から予想される候補遺伝子について物理的マッピングを行い責任領域にあるかを調べることで、責任遺伝子の同定を急ぐ。各変異体について、運動時の筋電位変化を測定し、神経の異常と筋の異常に分類する。責任遺伝子が同定された後は発生学的手法も加えて、遺伝

子の異常と行動の異常をつなげるシナプス伝達の異常、細胞内イオン制御の異常、回路の異常などを解析する。ヒトで同じ遺伝子の変異による運動障害が報告されている場合、ゼブラフィッシュ変異体が疾患のモデル動物となるかを病理解析で検討する。また、変異体にアンチセンスモルフォリノを導入して遺伝子発現を変化させたり、薬剤を投与したりして、表現型を軽減できるかを実験することにより、治療実験を視野に入れた動物モデルとしての有用性を検討する。

### <2007年度の成果>

泳動が遅い自然突然変異体として単離された運動異常変異体 *relatively-relaxed* (*ryr*) について解析を完了した。まず、この変異体で神経系が正常に機能することを運動時の速筋、遅筋からの電位記録で明らかにし、異常部位が筋であることが分かった。次に筋にカルシウム蛍光指示薬 Calcium Green-1 dextran をモザイク状に取り込ませてカルシウムイメージングを行い、変異体で遅筋は正常であるが、速筋では運動時の小胞体から細胞質へのカルシウム放出が減少していることを明らかにした。筋で電位変化をカルシウム放出に変換するシステムである excitation-contraction coupling 機構に異常があることが予想されるが、これを行うための分子である細胞膜上のジヒドロピリジン受容体（電位センサー）と小胞体膜上のリアノジン受容体（カルシウム放出チャンネル）が速筋で正常に局在していないことを免疫染色で見いだした。また、リアノジン受容体タンパクは巨大なタンパクの4量体なので電子顕微鏡解析で電子密度が高いドットとしてT管に観察できるが、変異体ではT管にリアノジン受容体タンパクは見られなかった。変異のマッピングから責任遺伝子は染色体18番上にあることが分かっていたが、詳細にマッピングを行い、リアノジン受容体遺伝子を含む領域に変異をしばりこんだ。野生型、および変異体からリアノジン受容体 cDNA をクローニングし、変異体ではコーディング領域中に32 bpの塩基挿入があり、全長タンパクの真ん中あたりで終止コドンが生じることが分かった。ゲノムを解析するとエキソン48とエキソン49の間のイントロンに4 kbのDNA挿入があり、cDNA中の32 bpの挿入はこのゲノム挿入の一部であることが分かった。ゲノムに挿入されたこの4 kbの配列はトランスポゾンによる転移と考えられる。リアノジン受容体の遺伝子はin situ hybridizationから速筋に発現することが確認され、筋での異常と合致した。以上から、*ryr* 変異体はリアノジン受容体のスプライシング異常により、リアノジン受容体タンパクが正常に合成されず、筋小胞体から細胞質へのカルシウムイオンを放出が低下し、筋収縮力が減少し、泳動時に十分な駆動力を発揮できないために逃避運動時に泳ぎが遅くなることとなった。

ヒトでリアノジン受容体の変異には優性遺伝するミオパチーで

あるセントラルコア病（筋の中央に大きな穴が形成される）と劣性遺伝するミオパチーであるマルチミニコア病（筋に無数の穴が形成される）が知られるので、*ryr* 変異体がこれらの筋疾患のモデル動物になるかを検討した。*ryr* 変異体の筋を電子顕微鏡で解析すると、筋に無数の穴があり、マルチミニコア病と類似した病態が観察された。しかも、コア構造はステージが進むと大きくなり、進行性であることが確認され、*ryr* 変異体は遺伝学的にも病理学的にもマルチミニコア病の動物モデルになると言える。また、変異体で起こる異常なスプライシングを阻害するようなアンチセンスモルフォリノを導入して、異常なエキソンをスキップして正常なスプライシングを回復させることで *ryr* 変異体の運動異常をキャンセルする実験を行い、運動障害を治療することに成功した。*ryr* 変異体はマルチミニコア病の治療モデルとしても有用であることが分かり、これを *Development* 誌に論文発表した。

他にも 4 系統の変異体 (mi262, mi264, mi310, mi371, mi372) の解析を進め、それぞれ変異のある染色体 (24 番、5 番、6 番、2 番、3 番) を同定し、その責任領域を 1 cM 以内に狭めた。いくつかは責任領域を狭める作業を既に終了し、候補遺伝子のクローニング、塩基配列決定を進めており、変異の同定を急いでいる。

#### <国内外での成果の位置づけ>

ゼブラフィッシュを用いた運動の研究をしているグループは世界で数カ所あるが、遺伝学や発生学といった古典的なゼブラフィッシュの解析手法に加えて、パッチクランプやカルシウムイメージングといった生理的技術を用いた機能解析を行っているグループは少なく、研究代表者は先端の技術を応用し、独創的に研究を展開しているといえる。

マルチミニコア病の疾患モデルになると期待されたリアノジン受容体のノックアウトマウスは新生致死となるため、疾患のモデル動物としては利用できなかったが、研究代表者が確立した *ryr* 変異体は遺伝形式が同じ（劣性遺伝する運動障害）であるだけでなく、病理診断の基準になるミニコア形成においてもヒトの症例と同じ表現型を示すことから、マルチミニコア病のはじめのモデル動物となる。また、アンチセンス鎖を導入することでリアノジン受容体の mRNA スプライシングの異常を直し、*ryr* 変異体の運動障害を治療する実験にも成功しており、これでモデル動物としての有効性は示されていたと言える。ゼブラフィッシュ *ryr* 変異体と酷似したスプライシング異常によるマルチミニコア病が実際にヒトで報告されており、*ryr* 変異体の運動障害を治療した実験はヒトでのエキソンスキップ治療につながると期待される。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

2007 年度中に *ryr* 変異体以外にも 5 系統の変異体の責任遺伝子同定を全て終わらせる予定だったが、*ryr* 変異体の論文のリバイズに時間がかかったため、残りの 5 系統の変異体の解析は遅れており、責任遺伝子はまだ決定していない。また、そのうち、1 つ (mi310) はゲノム解読が非常に遅れているところに責任遺伝子があり、これも変異の同定を遅れさせている原因の 1 つである。

#### <今後の課題>

マルチミニコア病に関連してゼブラフィッシュ *ryr* 変異体を用いて行える実験は全て行ったが、ヒトの疾患治療に関する実験は何も行っていない。*ryr* 変異体と酷似したスプライシング異常によるマルチミニコア病について臨床研究しているグループがアメ

リカにあるので、その研究チームとデータを共有して応用を考えたい。

*ryr* 変異体以外の 5 系統の変異体についてマッピングを進め、候補遺伝子をクローニングして変異同定を急ぐ。また、電気生理を行い、異常部位（神経 or 筋）を特定し、生理的機能の異常を解析する。異常部位が分かれば *in situ hybridization* や免疫染色といった発生学的手法を用いてマーカーの発現や形態に異常がないかを調べる。最終的には 1 つの遺伝子の変異で、どこでどういう機能の異常が発生し、どのように運動異常が起こるかをあますところなく明らかにする。さらにヒトの疾患のモデルになりうる場合には病理的にも同じ症状を示すかを調べた上で、治療モデルに使えるかを検討したい。これまでは変異体の責任遺伝子は他の生物で報告されたことのある既知遺伝子であったが、もし責任遺伝子が新規の遺伝子であった場合、そのヒト相同遺伝子の存在する染色体部位にヒトの運動障害がマップされているかを調べたい。責任遺伝子がヒトの疾患の原因遺伝子である可能性がある場合、患者サンプルをもつ臨床グループと共同研究して変異の有無を明らかにする。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文／プロシーディング

##### 1. 0708040927

Hiromi Hirata\*, Takaki Watanabe, Jun Hatakeyama, Shawn M. Sprague, Louis Saint-Amant, Ayako Nagashima, Wilson W. Cui, Weibin Zhou and John Y. Kuwada. (2007) Zebrafish *relatively-relaxed* mutants have a ryanodine receptor defect, show slow swimming and provide a model of multi-minicore disease. *Development* 134: 2771-2781. (\*Corresponding author)

##### 2. 0801162007

Louis 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.

##### 3. 0801162011

Hiromi Hirata. (2007) Locomotion research with zebrafish. *Jpn. J. Neuropsychopharmacol.* 27: 127-134.

##### 2) データベース／ソフトウェア

なし