

変異体とゲノム情報に基づく運動システムの包括的解析

●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>

運動や行動の遺伝学的解析はこれまで主にハエや線虫などの無脊椎動物を用いて行われ、神経や筋についての多くの知見をもたらしてきた。しかし、これらのモデル動物では電気生理学的解析が困難であること、神経系の構造が脊椎動物のものとは大きく異なることから、脊椎動物への応用ができないこともあった。一方、マウスやラットなどの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てきたが、研究室レベルでの変異体スクリーニングは施設やコストの点から容易ではなかった。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ることから、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。研究代表者は運動や行動を制御する遺伝子を明らかにし、遺伝子からタンパク質、さらには回路や運動・行動までを包括的に理解することを目的として、本研究課題を行っている。

これまでに、ゼブラフィッシュをピンセットで1個体ずつついでて刺激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行ってきた。この時、外見上の形態異常を伴うものを除外することにより、外見上の発生は正常であるが、おそらく生理機能に異常のある変異体を単離することができる。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はずだが、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することができる。並行して遺伝学的に変異のマッピングを行い、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、gain of function, loss of functionを行い、責任遺伝子であることを必要十分に確認する。また、その発現部位をin situ hybridizationで調べることで異常部位、細胞を同定する。責任遺伝子の分子機能については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に生理解析を行う。このように遺伝学的・分子生物学・発生生物学的解析と生理・行動学的アプローチを並行することにより、脊椎動物の運動システムの包括的解析ができると期待される。研究代表者はこれまでも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そのトランスポーターの変異を同定し、それらによる運動制御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ということが分かっている。運動・行動異常の治療実験に使える疾患モデルも得られており、本研究は疾患の動物モデルを作製する有効な方法でもある。

<2008年度の研究の当初計画>

これまでに単離してきた全変異体についてマッピングを進め

る。ゼブラフィッシュのゲノム情報はVersion 7がEnsembleとして公開されている。このゲノムプロジェクトは2年以内に終了すると言われているが、すでに大部分が利用可能であり、変異体の責任遺伝子同定は早ければ2ヶ月、長くても半年できると期待される。遺伝学的マッピングと同時に、表現型や電気生理から予想される候補遺伝子についてラディエイションハイブリッドパネルを用いた物理的マッピングを行い、責任遺伝子の同定を急ぐことができる。責任遺伝子が同定された後はそれが発現する組織をin situ hybridization法で調べ、過剰発現、ノックダウンを行って機能解析をするなど、発生学的手法を取り入れ、発現と機能の両面から運動システムの解明に迫る。発現部位が分かれば電気生理を用いたピンポイントの機能解析が可能となり、遺伝子の異常と運動・行動の異常をつなげる細胞内イオン制御やシナプス伝達、あるいは機能的神経回路の異常を解析できる。今年度は4ラインある運動時に引きつけを起こす変異体の責任遺伝子同定を重点的に行い、これが人の運動障害とどう関係にあるのかを明らかにする。

<2008年度の成果>

本来ゼブラフィッシュは刺激応答時に尾をなめらかに左右に振る逃避運動をするが、引きつけを起こしたようにぎこちない運動をする変異体が4系統(劣性遺伝するものがmi262, mi264, mi371の3系統、優性遺伝するものがmi294の1系統)ある。これら4系統について責任遺伝子を同定する目的でマッピング、クローニングを行い、mi262でナンセンス変異、mi264, mi294でミスセンス変異、mi371で1塩基欠失によるフレームシフト変異をcDNA上で確認した。劣性遺伝するmi262と優性遺伝するmi294の責任遺伝子は同一であった。これらの計3遺伝子全てにおいて、アンチセンスモルフォリノを用いたノックダウン実験を行い、引きつけを起こしたような異常運動を再現することに成功した。mi264, mi371の2遺伝子についてはin vitroで合成したRNAを導入することで変異体を回復させるレスキュー実験にも成功し、該当遺伝子が変異体の責任遺伝子であることを必要十分に確認した。mi262, mi294の遺伝子についてはまだレスキュー実験を行っていないが、責任遺伝子として確信している。先行しているmi262, mi294の2遺伝子についてin situ hybridization法で発現部位を確認し、それらが神経系と筋に広く発現する結果を得た。どちらも筋で発現が強いことから、筋の異常により、引きつけを起こすような異常運動が起こるものと考えている。これらの変異体が人の運動障害の動物モデルになるかはまだ断定できないが、同定した責任遺伝子3つのうち、mi262, mi294の責任遺伝子は筋力低下症の原因遺伝子であり、mi371の責任遺伝子は筋ジストロフィーの原因遺伝子であることを考えると、これらの変異体から新しい疾患モデルを提唱できるのではないかと期待できる。もう1つ

の mi264 の責任遺伝子がヒトの疾患に関係するという報告はない。

<国内外での成果の位置づけ>

ゼブラフィッシュを用いて運動・行動の研究をしているグループは世界で 10 カ所以上あるが、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て、変異体を解析しているグループは少なく、研究代表者は独自のスタイルで地道に研究を展開しているといえる。また、解析している変異体系統は研究代表者が自らスクリーニングをして単離したものである。本年度解析した変異体 4 系統は表現型が稚魚期に回復するものであり、表現型が見られるタイムウィンドウが狭いことから、他のグループが同一の変異体を単離することは難しいと考えられ、オリジナルな変異体で研究を展開している。研究代表者は基礎研究として運動システムの機能的発生を研究しているが、同時に運動障害のモデル動物の確立という実用的発展を常に視野に入れている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

mi262, mi294 の系統についてはレスキュー実験がまだ終わっておらず、これについては今後行いたい。その他については計画どおりに進んでいると言える。ここで紹介した 4 系統以外にもさらに 2 系統の責任遺伝子同定を進めているが、それらは困難な状況にあり、進捗が遅い。これは version 7 のゲノムデータベース中で変異を含む責任領域の情報に間違いがあり、責任領域を狭めていく過程で行き詰まるからである。最近になって version 8 の Pre ensemble が公開されたので、これが該当領域について正確なデータであれば、問題は解決して、責任遺伝子を同定できるだろうと期待される。

<今後の課題>

現在解析している 4 系統の変異体について責任遺伝子は分かったが、なぜ運動異常が起こるのかは現時点では明らかではない。パッチクランプやカルシウムイメージングなどの生理的解析を進めることで、その問いに答えたい。また、責任遺伝子がヒトの筋力低下症や筋ジストロフィー病に関係するようだが、本当に同じ病態を示すのかを明らかにして、疾患の動物モデルになりうるかをテストする。疾患モデルとして使えることが分かれば、それがどういふ変異かにもよるが、遺伝子治療実験等、有用なアプリケーションがあるかを検討したい。また、mi264 については現時点では疾患との関わりがないが、ヒトの運動障害の新しい原因遺伝子の候補になるので、そのファミリータンパクまで広く視野に入れて、疾患との関連を調べる予定である。

上記以外の 2 系統の変異体についても、version 8 のデータベース次第でマッピングを進め、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）、可能であれば異常な細胞を特定し、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、どこでどういふ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。これまでに同定された変異体の責任遺伝子の多くは他の生物で報告されたことのある既知遺伝子であることが多

かったが、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る。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. 0812222119

Zhou, W., Horststick, E.J., Hirata, H., Kuwada, J.Y. (2008) Identification and expression of voltage-gated calcium beta subunits in zebrafish. *Dev Dyn* 237: 3842-3852.

2. 0801162007

Saint-Amant, L., Sprague, S.M., Hirata, H., Li, Q., Cui, W.W., Zhou, W., Poudou, O., Hume, R.L., Kuwada, J.Y. (2008) The zebrafish ennui behavioral mutation disrupts acetylcholine receptor localization and motor axon stability. *Dev Neurobiol* 68: 45-61.

2) データベース/ソフトウェア

なし

班員間の共同研究:

実験試料や解析について、近藤滋教授（生命システム情報）、武田洋幸教授（生命システム情報）、川上浩一教授（比較ゲノム）、東島眞一准教授（生命システム情報）との緊密な連携をはかっている。