

小型魚類で明らかにする生老病死

松井秀彰

新潟大学脳研究所脳病態解析分野

Seeing Life and Death using Small Fish

Hideaki MATSUI

Department of Neuroscience of Disease, Brain Research Institute, Niigata University

要 旨

ここでは小型魚類を使った筆者らの発生・老化・疾患研究について概説する。まず、ゼブラフィッシュ稚魚の可視性を活かした小脳の機能発生研究、遺伝性パーキンソン病のメダカおよびゼブラフィッシュモデル、そして老化モデルアフリカメダカを使った孤発性パーキンソン病研究を解説する。さらにそれらの研究をどの様にヒトへの応用へ結びつけていこうとしているかその試みを紹介する。小型魚類は基礎生物学のみならず、老化や疾患研究にも利用可能であり、様々な生命現象および疾患への適用が期待される。

キーワード：小型魚類，パーキンソン病，メダカ，ゼブラフィッシュ，アフリカメダカ，老化，加齢関連疾患

はじめに

ここでは筆者らの小型魚類を使った発生・老化・疾患研究について概説する。ゼブラフィッシュ稚魚の可視性を活かした小脳の機能発生研究、遺伝性パーキンソン病のメダカおよびゼブラフィッシュモデル、そして老化モデルアフリカメダカを使った孤発性パーキンソン病のモデルを解説する。さらにそれらの研究をどの様にヒトへの応用へ結びつけていこうとしているかその試みを紹介する。

小型魚類とは

脳研究所脳病態解析分野 松井研究室では様々な研究対象を解析することでヒトの難病や老化、

あるいは発達障害にチャレンジしている。その研究対象は *in vitro*、培養細胞、マウス、ヒトサンプル、ヒト剖検脳と多岐にわたるが、なかでも様々な小型魚類を用いている点の特徴である。詳細は研究室ホームページ、https://www.bri.niigata-u.ac.jp/~neuroscience_of_disease/、も見ていただきたい。

小型魚類、ここではまずゼブラフィッシュやメダカを考えてみる。これらの小型魚類は扱いやすいという点、特にその稚魚が比較的透明に近い点から、

- i: 全中枢神経も局所も、生きてままだ行動中でも観察できる脊椎動物
- ii: 逆遺伝学的手法も順遺伝学的手法も使える脊椎動物
- iii: スクリーニング的に使える脊椎動物

である。ここで強調したいのはこのようなことを通常の研究室レベルで可能にするのは、脊椎動物ではほぼ小型魚類しかないのではないかと、ということである。ショウジョウバエや線虫や酵母は大変に素晴らしいモデルであり、研究の歴史という点では小型魚類のほうが後塵を拝する。しかし如何せん脊椎動物ではないためにヒトの発生や老化、あるいは疾患を考えるにあたっては難しい面も多々ある。マウスでも確かに生きたままの観察や順遺伝学的手法は不可能ではないが、そのサイズや飼育にかかる費用、あるいは実験手技などを考えると、通常の実験室では相当難しい。筆者らは2006年頃に小型魚類をパーキンソン病モデルとして利用できないか研究を始めたが、小型魚類はヒトの発生や老化、あるいは疾患を考えるにあたってちょうどよいポジションに位置していると感じている。

小型魚類を使ってライブイメージングで観察できるものの例を挙げる。臓器の例としては大きく動かないとわかりにくいので外眼筋の例を挙げる。本研究ではゼブラフィッシュの外眼筋の発生に必要な遺伝子の解析を行ったが、その際に外眼筋を蛍光標識したゼブラフィッシュ系統を作製している。そのゼブラフィッシュに動く縞模様を見せることで眼球運動を誘発し、その際の外眼筋の動きを共焦点顕微鏡でライブイメージングしている¹⁾。ついで細胞の例として小脳プルキンエ細胞を挙げる。先程のようにゼブラフィッシュに動く縞模様を見せることで眼球運動や遊泳運動を誘発することができる。その際の小脳全体におけるプルキンエ細胞の活動をモニタリングし、解剖学的な解析や光遺伝学を用いた解析とあわせてゼブラフィッシュ小脳の機能地図を描き出している²⁾。この研究はのちほど詳細を述べる。細胞よりも小さなものもライブイメージングが可能で発生過程における細胞内小器官のポジショニングの研究などの例を見ていただきたい³⁾。

筆者らのゼブラフィッシュ小脳の機能地図の研究についてより詳細に説明する。小脳の領域化は、これまで主に小脳求心性神経の軸索投射の解剖学的マッピングから推論されてきた。小脳の出力も

同様に領域化されていることが病変研究や色素トレーサー実験から示唆されているが、そのような出力領域化の生理的意義や機能との関連性はあまり明らかではない。このような機能的な領域化は、*in vivo* で非侵襲的に示されることが理想である。筆者らは、ゼブラフィッシュのプルキンエ細胞の出力回路を遺伝学的にラベルしたり、経シナプス標識をしたりすることで、小脳皮質からの出力が領域化されていることを明らかにした。これらの領域化は、行動中のゼブラフィッシュ稚魚が小脳に依存した行動をとっているときのプルキンエ細胞の活動の領域化パターンと一致していることがわかった。さらに、行動中に特定のプルキンエ細胞領域に光遺伝学により介入することで、プルキンエ細胞の神経回路の機能的な領域化も確認された。これらの結果から、ゼブラフィッシュ小脳の各部位が、それぞれの行動課題に応じた特殊な神経回路を持ち、その特徴的な機能を果たしていることを明らかにした²⁾。

遺伝性パーキンソン病のモデル

ついで、疾患研究の例を挙げる。筆者らはパーキンソン病の病態研究のために様々な小型魚類を利用してきた。パーキンソン病は高齢者に多く、進行性の運動障害、黒質ドパミン神経の脱落、レビー小体と呼ばれる α シヌクレイン陽性の封入体などを特徴とする。

筆者らを含めた複数のグループが小型魚類のドパミン神経のアトラスを報告している⁴⁾⁵⁾。小型魚類に例えば1-メチル-4-フェニル-1, 2, 3, 6-テトラヒドロピリジン (MPTP) や6-ヒドロキソドパミン (6-OHDA) などの毒物を暴露すると、ドパミン神経変性や自発運動の低下といったヒトパーキンソン病の特徴を模す事ができる⁶⁾⁷⁾。そういった毒物に対する脆弱性、自発運動制御への関与、ならびに線条体への投射を認める神経の存在、などから間脳中央部に存在する比較的大きな細胞体を持つ細胞群が黒質ドパミン神経に相当すると考えている⁸⁾⁹⁾。この傾向は様々な遺伝子改変モデルにおいても同様であり、多くの場合はやはり間

脳中央部に存在するドーパミン神経が脆弱である^{10)–13)}。いくつかのモデルは詳細を次に述べる。

ところでそもそも最も代表的なモデル動物と言って良いマウスにおいて、遺伝子改変でヒトパーキンソン病を模倣することは意外と難しい。例えば常染色体劣性家族性パーキンソン病の原因遺伝子である *Parkin*, *PINK1*, *DJ-1* の三重ノックアウトマウスにおいてすらドーパミン神経の脱落を認めないとされている¹⁴⁾。このうち *Parkin*, *PINK1* についてはショウジョウバエや培養細胞の研究で見いだされた *PINK1* が上流で *Parkin* が下流でミトファジーに機能するという研究が有名である^{15)–18)}。筆者らは *Parkin*, *PINK1* の二重ノックアウトメダカを解析し、そこでは *Parkin*, *PINK1* のシングルノックアウトでは観察されなかったドーパミン神経の脱落が生じることを明らかにした。マウス胎児線維芽細胞でも *Parkin*, *PINK1* の二重欠失においてそれぞれの単独欠失に比してミトコンドリア障害や細胞死が増強した。つまり *PINK1* と *Parkin* は脊椎動物においては上下流のパスウェイだけでなく、それぞれ別々のパスウェイにおいてもミトコンドリア機能維持やドーパミン神経維持に働いていることが示唆された¹¹⁾。なおゼブラフィッシュでは *PINK1* のシングルノックアウトだけでドーパミン神経変性を認める⁵⁾¹²⁾。ゼブラフィッシュとメダカでは同じ小型魚類ではあるが、パーキンソン病モデルとしての側面一つとっても異なる面があると言えよう。

別の常染色体劣性家族性パーキンソン病の原因遺伝子である *ATP13A2* のノックアウトメダカではカテプシン D の減少および酵素活性の低下、ドーパミン神経の変性を認める。電子顕微鏡では中枢神経に Finger-print 構造を認め、これはいくつかのリソソーム病で観察される構造であることから、*ATP13A2* 変異によるパーキンソン病はリソソーム病と共通の病態を持っている可能性が示唆された¹⁰⁾。孤発性パーキンソン病の危険因子の一つに GBA の変異が挙げられるが、GBA ノックアウトメダカではドーパミン神経変性だけでなく α シヌクレインの蓄積も再現された¹³⁾。

このようにゼブラフィッシュやメダカに対して毒物負荷や遺伝子改変などを実施することにより、様々なパーキンソン病モデルを作出し得る。このことはパーキンソン病に関連する分子の生体における機能を解析するために大変に有用である。しかし実のところ 90%–95% のパーキンソン病は家族性ではなく孤発性であり、毒物等への暴露歴もない。この点にアドレスするにはどうしたらよいであろうか？

孤発性パーキンソン病のモデル

そこで筆者らが注目したのがアフリカメダカである。アフリカメダカはモザンビーク等の池というか沼というかほぼ水たまりに棲息する小型魚類である。その棲息地域では乾期と雨期が存在し、乾期にはアフリカメダカが棲息する池？水たまり？の水が干上がるため、アフリカメダカの成体は全滅する。しかしながら乾燥に強い卵を土中に産卵し、その卵が次回以降の雨期に孵化するという生活史をとることで種として存続してきた。この環境ではアンチエイジングへの正の選択圧が働かない。そのためかアフリカメダカは寿命が短く、また非常に短期の間に老化の表現型を呈する¹⁹⁾。具体的にはアフリカメダカの寿命は 5 ヶ月～8 ヶ月程度であり、3 ヶ月齢前後で臓器の萎縮、脊柱彎曲、老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼの上昇など、老化の様々な兆候を示す^{20)–22)}。

パーキンソン病は加齢と強く関連しているが、ほとんどの実験動物は加齢に伴う十分な表現型を示さないことがある。筆者らはアフリカメダカが、加齢に伴いドーパミン神経およびノルアドレナリン神経の変性と α シヌクレイン病理の進行を示すことを明らかにした。これらの病理学的表現型は、ヒトのパーキンソン病で観察されるものと類似している。また、 α シヌクレインを遺伝子的に除去すると神経変性が改善されることから、 α シヌクレインはパーキンソン病の病態における傍観者ではなく、神経変性の原因タンパク質であることが示唆される。アフリカメダカは、 α シヌクレイン依存性の神経変性、加齢に伴う表現型、 α シ

ヌクレイン病理の進行など、パーキンソン病、特に大多数を占める孤発性パーキンソン病のメカニズムを明らかにする可能性を持っている²³⁾。

魚からヒト疾患へ

それでは小型魚類の知見からヒト疾患の病態解明にさらに近づくことは可能であろうか？私達は上記の様々なパーキンソン病モデルを観察することで、その細胞質に小さなDNAのドットが存在することに気がついた。そして、DNase II等による分解から逃れたミトコンドリア由来の細胞質DNAが、パーキンソン病を模す培養細胞およびゼブラフィッシュにおいて、細胞毒性および神経変性を誘導することを報告した²⁴⁾。培養細胞においてパーキンソン病に関連する遺伝子の産物であるPINK1, GBA, またはATP13A2の減少は、ミトコンドリア由来の細胞質DNAの増加を引き起こし、I型インターフェロン応答と細胞死を誘導する。これらの表現型は、DNAを分解する酵素DNase IIの過剰発現、またはミトコンドリアDNAのセンサーとして機能するIFI16の減少によって改善した。パーキンソン病モデルとして用いられるゼブラフィッシュの1つ *gba* 変異ゼブラフィッシュにおいても、ヒトDNase IIを過剰発現させることにより、その運動障害とドパミン神経変性が改善された。IFI16およびミトコンドリア由来の細胞質DNAは、パーキンソン病患者の剖検脳病変部位において蓄積を認めた。以上の結果は、ミトコンドリアDNAの細胞質への漏出がパーキンソン病の神経変性の重要な原因となることを示唆している²⁴⁾。細胞質に漏出したミトコンドリアDNAの分解、あるいはそのミトコンドリアDNAセンサーの阻害が、パーキンソン病の治療につながる可能性が想定され、新規治療法開発に結びつけることができないか研究 중이다。また日本のメダカの野生型にはアフリカメダカとほぼ同じアミノ酸配列の α シヌクレインがあるもののパーキンソン病の表現型は認められない。そのことに注目し発見した新規の α シヌクレイン翻訳後修飾も同様に新規治療法につながる可能

性を秘めている。

魚を観察することでパーキンソン病の新しい病態が明らかになるかもしれない。小型魚類研究の門戸はパーキンソン病のみならず様々な加齢関連疾患や発達障害にも開かれている。新潟大学およびその他の方々に小型魚類を利用した生老病死の研究に興味がある方はぜひ、メール相談や研究室見学を考えてほしい。

文 献

- 1) Matsui H, Dorigo A, Buchberger A, Hocking JC, Distel M and Köster RW: Zebrafish jam-b2 Gal4-enhancer trap line recapitulates endogenous jam-b2 expression in extraocular muscles. *Dev Dyn* 244: 1574-1580, 2015.
- 2) Matsui H, Namikawa K, Babaryka A and Köster RW: Functional regionalization of the teleost cerebellum analyzed in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 11846-11851, 2014.
- 3) Distel M, Hocking JC, Volkmann K and Köster RW: The centrosome neither persistently leads migration nor determines the site of axonogenesis in migrating neurons in vivo. *J Cell Biol* 191: 875-890, 2010.
- 4) Rink E and Wullimann MF: Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res* 1011: 206-220, 2004.
- 5) Matsui H and Sugie A: An optimized method for counting dopaminergic neurons in zebrafish. *PLOS ONE* 12: e0184363, 2017.
- 6) Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Uemura K, Takeda S and Takahashi R: A chemical neurotoxin, MPTP induces Parkinson's disease like phenotype, movement disorders and persistent loss of dopamine neurons in medaka fish. *Neurosci Res* 65: 263-271, 2009.
- 7) Matsui H, Ito H, Taniguchi Y, Inoue H, Takeda S and Takahashi R: Proteasome inhibition in medaka brain induces the features of Parkinson's disease. *J Neurochem* 115: 178-187, 2010.

- 8) Matsui H: Dopamine system, cerebellum, and nucleus ruber in fish and mammals. *Dev Growth Differ* 59: 219-227, 2017.
- 9) Matsui H: The Use of Fish Models to Study Human Neurological Disorders. *Neurosci Res* 120: 1-7, 2017.
- 10) Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N and Takahashi R: ATP13A2 Deficiency Induces a Decrease in Cathepsin D Activity, Fingerprint-like Inclusion Body Formation and Selective Degeneration of Dopaminergic Neurons. *FEBS Lett* 587: 1316-1325, 2013.
- 11) Matsui H, Gavinio R, Asano T, Uemura N, Ito H, Taniguchi Y, Kobayashi Y, Maki T, Shen J, Hattori N, Takeda S, Uemura K, Yamakado H and Takahashi R: PINK1 and Parkin complementarily protect dopaminergic neurons in vertebrates. *Hum Mol Genet* 22: 2423-2434, 2013.
- 12) Flinn LJ, Keatinge M, Breaud S, Mortiboys H, Matsui H, De Felice E, Woodroof HI, Brown L, McTighe A, Soellner R, Allen CE, Heath PR, Milo M, Muqit MM, Reichert AS, Köster RW, Ingham PW and Bandmann O: TigarB causes mitochondrial dysfunction and neuronal loss in PINK1 deficiency. *Ann Neurol* 74: 837-847, 2013.
- 13) Uemura N, Koike M, Ansai S, Kinoshita M, Ishikawa-Fujiwara T, Matsui H, Naruse K, Sakamoto N, Uchiyama Y, Todo T, Takeda S, Yamakado H and Takahashi R: Viable neuronopathic Gaucher disease model in medaka (*Oryzias latipes*) displays axonal accumulation of alpha-synuclein. *PLOS Genet* 11: e1005065, 2015.
- 14) Kitada T, Tong Y, Gautier CA and Shen J: Absence of nigral degeneration in aged parkin/DJ-1/PINK1 triple knockout mice. *J Neurochem* 111: 696-702, 2009.
- 15) Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR and Youle RJ: PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLOS Biol* 8: e1000298, 2010.
- 16) Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, May J, Tocilescu MA, Liu W, Ko HS, Magrané J, Moore DJ, Dawson VL, Grailhe R, Dawson TM, Li C, Tieu K and Przedborski S: PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 378-383, 2010.
- 17) Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, Yoo SJ, Hay BA and Guo M: *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with Parkin. *Nature* 441: 1162-1166, 2006.
- 18) Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, Bae E, Kim J, Shong M, Kim JM and Chung J: Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441: 1157-1161, 2006.
- 19) Valdesalici S and Cellerino A: Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Proc Biol Sci* 270: S189-S191, 2003.
- 20) Genade T, Benedetti M, Terzibasi E, Roncaglia P, Valenzano DR, Cattaneo A and Cellerino A: Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. *Aging Cell* 4: 223-233, 2005.
- 21) Valenzano DR, Terzibasi E, Cattaneo A, Domenici L and Cellerino A: Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell* 5: 275-278, 2006.
- 22) Harel I, Benayoun BA, Machado B, Singh PP, Hu CK, Pech MF, Valenzano DR, Zhang E, Sharp SC, Artandi SE and Brunet A: A platform for rapid exploration of aging and diseases in a naturally short-lived vertebrate. *Cell* 160: 1013-1026, 2015.
- 23) Matsui H, Kenmochi N and Kazuhiko N: Age- and α -Synuclein-Dependent Degeneration of Dopamine and Noradrenaline Neurons in the Annual Killifish *Nothobranchius furzeri*. *Cell*

- Rep 26: 1727-1733, 2019.
- 24) Matsui H, Ito J, Matsui N, Uechi T, Onodera O and Kakita A: Cytosolic dsDNA of mitochondrial origin induces cytotoxicity and neurodegeneration in cellular and zebrafish models of Parkinson's disease. *Nat Commun* 12: 3101, 2021.
-