

ミニレビュー

病態生理学ハイライト

No. 1

医学研究におけるゼブラフィッシュの活用法

Research methods using zebrafish

病態生理学分野 川原 玄理

Department of Pathophysiology :

Genri KAWAHARA

近年、多くの研究分野において、小型魚類であるゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) やメダカ (*Oryzias latipes*) が使われるようになってきている。小型で飼育が容易で、多産であり、世代のサイクルが短いことが、遺伝学をはじめ様々な研究に適している。また、外部から器官を観察することが容易なこともあり、疾患モデル動物としても非常に高い価値が見いだされている。本稿では、主に疾患モデルフィッシュの開発法、そして疾患モデルフィッシュを用いたケミカルスクリーニングに関し、自験例を中心に紹介させていただく。

ここ数年、様々なゲノム編集技術が発展してきており、新たな技術が次々と登場している。Zinc

finger nuclease、TALENs、CRISPR-Cas9 システムが主なものであり、培養細胞への遺伝子変異導入や、動物モデルを作製する場合にも注目されている技術である。特に CRISPR-Cas9 システムは最近開発され、ゼブラフィッシュにおいてもノックアウト動物 (1)、ノックイン動物 (2) を作製する際にこの技術が活用されている。CRISPR-Cas9 システムは、簡単に述べると2種類の RNA (Cas9-mRNA とガイド RNA) を用いたゲノムを編集方法である。Cas9-RNA はヌクレアーゼである Caspase 9 (Cas9) タンパク質の mRNA であり、ガイド RNA (guide RNA, gRNA) はターゲットとするゲノム領域の配列と Cas9 タンパク質が結合する配列を含む RNA である。それらの2つの RNA をゼブラフィッシュの受精卵に同時にインジェクションする。Cas9 mRNA からヌクレアーゼである Cas9 タンパク質が翻訳合成され、gRNA の一端と複合体を形成し、他方の一端がターゲットとなるゲノム DNA の領域に特異的に結合することで、Cas9 タンパク質が特定のゲノム DNA 領域 (約 20 塩基対) の切断を行う (図 1)。

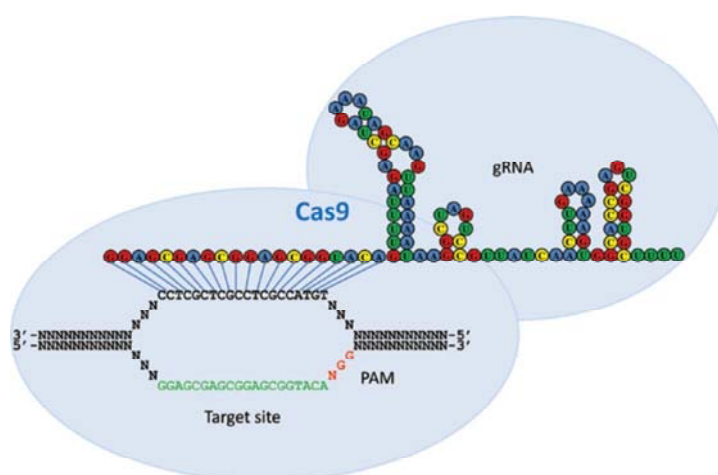


図 1. CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集

ターゲットとなるゲノム DNA 配列と相補的な RNA (緑文字) を含むガイド RNA (gRNA) を合成する。ヌクレアーゼである Cas9 タンパク質と複合体を形成し、目的の部位でゲノム DNA を切断できる。この Cas9 タンパク質は PAM (protospacer adaptor motif) 配列 (赤文字) を認識し、その上流にあたる部位で二本鎖 DNA を切断する。(From Hwang et al. Nat Biotechnol. 2013)

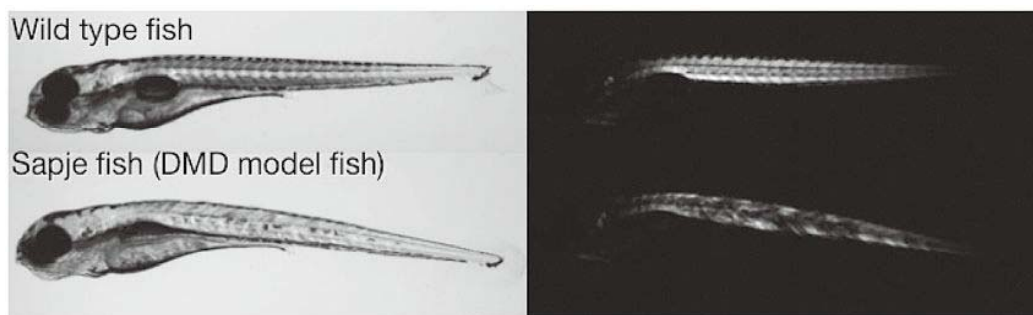


図2. 複屈折解析によるジストロフィン欠損ゼブラフィッシュの骨格筋構造解析
偏光フィルターを通した観察により骨格筋構造が観察可能である。野生型では非常に整った構造が観察される一方、ジストロフィン欠損型 (*Sapje*) では骨格筋構造の乱れが観察される。(川原ら 生体の科学、2011)

切断された領域では、DNA 修復の機構が働くが、その修復時に、ある割合で数個の塩基対の欠失や挿入といった遺伝子変異がおきることになる。ノックイン動物を作成する際には、この部位に挿入する DNA コンストラクトも同時にインジェクションする。これらの手法により、自在に遺伝子変異を導入した様々な個体を作製することが可能となり、遺伝子変異体の系統を確立していくことができるのである。

作製した小型魚類モデルを活用した研究手法の1つとして、ケミカルスクリーニングを紹介する。これは、治療に有効な化学物質を見出すことを目的とし、様々な種類の化学物質を含んだ化学物質ライブラリー（ケミカルライブラリー）と小型魚類モデルとを組み合わせ、スクリーニングを行うものである(3,4)。ゼブラフィッシュを用いたドラッグスクリーニングの利点は、飼育水の中に化学物質を添加して飼育することで、その効果を検証することが可能であること、そして発生初期の個体を用いた場合、その個体の小ささ（およそ5 mm）から96穴、48穴プレートのウェルの中で飼育可能であることがあげられる。多様な化学物質を網羅的に解析することが必要とされるドラッグスクリーニングでは、ゼブラフィッシュは非常に便利な要素を兼ね備えている。

ゼブラフィッシュを用いたドラッグスクリーニングの具体例として、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）モデルフィッシュであるジストロフィン欠損モデル (*Sapje*) を用いたドラッグスクリーニングを紹介する(5)。*Sapje* は、生後3日から4日で、骨格筋の構造異常が観察されるようになる(図2)。その後、生後10日程でほとんどのジストロフィン欠損変異体は死亡する。ゼブラフィッ

シユの骨格筋の状態は、偏光フィルターを用いた複屈折解析 (Birefringence assay) により簡便に検出することができる(4)。この方法は、ゼブラフィッシュの筋組織の状態を生きたまま、固定をせずに直接顕微鏡下で観察するものである。正常な骨格筋構造をもつゼブラフィッシュでは、非常に整った筋構造が観察されるが、ジストロフィン欠損モデルフィッシュでは、筋組織の構造異常が、筋線維の切断や配列の乱れとして検出される(図2)。我々はこの検出法を利用して、筋組織の異常を軽減するような化学物質の探索を行った(5)。DMDの場合、X染色体上に存在するジストロフィン遺伝子の変異により引き起こされるが、ゼブラフィッシュの場合は性決定機構が異なるため、ジストロフィン欠損モデルのヘテロ接合体同士の交配により得られる個体群では、25%の割合でジストロフィン欠損変異体が含まれている。これらの個体群を、ケミカルライブラリー内の各種の化学物質を含有した飼育水で飼育し、筋組織構造異常を軽減する効果をBirefringence解析により評価した。図3右で示した例のように、いくつかの化学物質を用いた場合において、筋構造異常を示す個体の割合が低下する結果が得られた。合計1,120個の化学物質を含むケミカルライブラリーをスクリーニングした結果、7種類の化学物質が筋組織構造異常を軽減する治療候補物質として見いだされた(5)。これらの中には phosphodiesterase (PDE) 阻害剤も含まれていたが、PDE阻害剤の効果はすでにDMDモデルマウスでもその効果が示されていることから、このゼブラフィッシュモデルを用いたケミカルライブラリーのスクリーニングが有効な薬剤を探し出す強力なツールとなり得ると考えられた。見いだされたこれらの候補物質をヒントに、

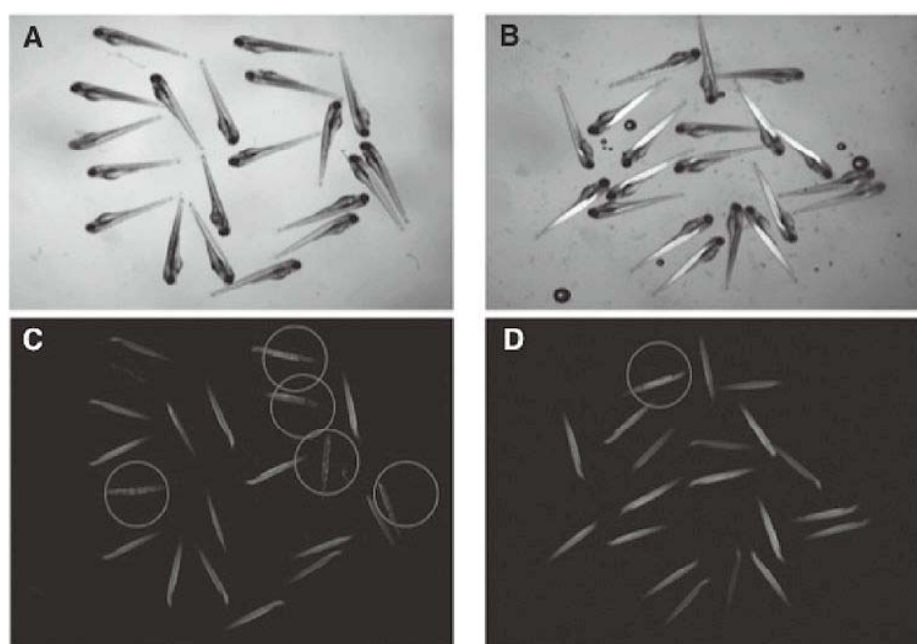


図 3. ジストロフィン欠損型ゼブラフィッシュの薬剤処理による骨格筋構造の異常回復効果
ジストロフィン欠損型ゼブラフィッシュのヘテロ接合体型同士の交配によって得られた受精胚 20 匹をそれぞれ異なる薬剤で処理した結果。左に示した処理群では、薬剤効果がなく 20 個体中 5 個体 (25%) で、筋構造異常が観察されたが (図 3C、円で囲まれた個体)、右に示した処理群では、薬剤処理後、20 個体中 1 個体 (5%) でのみ筋構造異常が観察され (図 3D、円で囲まれた個体)、薬剤処理による筋構造異常に対する回復効果が示唆された。A, B : 明視野での観察、C, D : 偏光フィルターを用いた Birefringence 解析による観察。(From Kawahara et al. PNAS 2011)

まだ明らかになっていない治療薬の開発や、その分子機序などを明らかにすることが可能となると考えられる。

最近の遺伝子編集技術の開発にはめざましいものがあり、特定の遺伝子変化を有するモデル動物を簡便に作製することが容易になってきている。一方で、GFP や RFP のような蛍光タンパク質を用いたモデルフィッシュを作製することにより、それらの蛍光タンパク質を指標に、高速で多数の化学物質をスクリーニングすることも可能となっている。簡便で迅速な解析が可能なることから、小型魚類は、器官発生などの基礎研究から治療薬開発などの応用研究まで、非常に幅広い分野において多くの利点を備えた動物モデルになりうるといえる。

現在、我々の研究室 (病態生理学分野、林由起子主任教授) では小型魚類モデルの活用のため、新規疾患モデルフィッシュの作製、繁殖施設の整備を行っている。今後、様々な研究分野と連携しながら

これらを活用していきたい。

文 献

- 1) Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. : Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* **31** : 227-229, 2013
- 2) Kimura Y, Hisano Y, Kawahara A et al. : Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Sci Rep.* **4** : 6545, 2014
- 3) Kawahara G, Kunkel LM : Zebrafish based small molecule screens for novel DMD drugs. *Drug Discov Today Technol.* **10** : e91-e96, 2013
- 4) 川原玄理, Louis M Kunkel. ゼブラフィッシュを用いた筋ジストロフィー研究手法. *生体の科学* **62** : 79-82, 2011
- 5) Drug screening in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. Kawahara G, Karpf JA, Myers JA, Alexander MS, Guyon JR, Kunkel LM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108** : 5331-5336, 2011.