



Title	超短命魚ターコイズキリフィッシュを用いた個体老化機構の解明
Author(s)	
Citation	令和3（2021）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書．2022
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/85605
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和3年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏名	にわ ともみ 丹羽 智美	学部 学科	理学部 生物科学科	学年	2年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	石谷 太	所属	微生物病研究所		
研究課題名	超短命魚ターコイズキリフィッシュを用いた個体老化機構の解明				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				
[研究目的]					
<p>個体老化は多数の要因が絡み合う現象であり、その制御の分子基盤の理解は遅れている。近年、線虫やショウジョウバエなどの短命な無脊椎動物モデルを用いた解析から、老化は制御可能であることがわかってきた。しかし、ヒトの個体老化機構を理解するためには、これら無脊椎動物モデルのみでは不十分であり、ヒトへの外挿性がより高い脊椎動物モデルにおける解析が必要である。一方、従来のモデル脊椎動物であるマウスやゼブラフィッシュは、寿命が3年以上あるため老化研究に膨大な時間がかかるという問題があった。そこで、本研究では、研究室で飼育可能な脊椎動物の中で最も寿命が短い(3~4ヶ月)超短命魚ターコイズキリフィッシュ(通称キリフィッシュ)を用いて実験を行った。</p> <p>本研究では、加齢に伴う Quality of life (QOL)の低下に直結する筋肉の老化に着目し、キリフィッシュの筋肉老化の分子マーカーの探索を行った。参加研究室の先行研究で、キリフィッシュの筋肉老化の分子的特徴を捉えるために筋肉の RNA シーケンス解析が行われていた。その結果、加齢に伴って顕著に発現量の変化が見られた上位 20 個の遺伝子のうち <i>fbxo32</i> と <i>zic1</i> に注目し(図1)、RT-qPCR による発現変化の検証と、遺伝子発現パターンの可視化を試みた。<i>fbxo32</i> はヒトやマウス等でも加齢とともに筋肉における発現量が増加し、筋萎縮を促進しうることが示されており、筋肉老化との関係が期待されている。そのため、キリフィッシュにおいても種を超えて共通した骨格筋の老化分子マーカーとして使えるかどうかを検証するために <i>fbxo32</i> を解析の対象に選んだ。一方で、<i>zic1</i> は神経系や小脳の発生や、骨格筋の背腹パターン形成に関係していることがよく知られているものの、発生期以降の機能はほとんど知られていない。老齢期で <i>zic1</i> の発現が増えることは興味深く、新たな老化制御機構の解明につながる可能性があると考え、調べることにした。</p>					

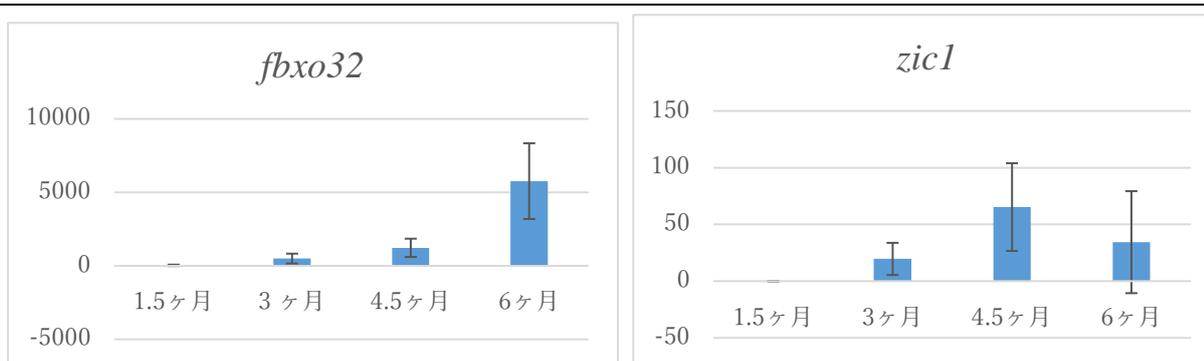


図1 キリフィッシュ骨格筋のRNAシーケンス解析によって示された *fbxo32* と *zic1* の発現量の加齢による増加

[実験]

1. RT-qPCR

生後 1.5 ヶ月のキリフィッシュと 5 ヶ月のキリフィッシュを 3 匹ずつ用い、骨格筋から抽出された RNA から逆転写した cDNA をテンプレートとして解析を行った。cDNA 合成の際には、RNA 量を定量し等量の RNA を逆転写に使用した。定量化の手法としては、まずは ΔCt 法により解析を行った。さらに、より正確な定量化を行うために内部標準を用いた検量線法を試みた。内部標準には、一般的に使われる、TATA 配列に結合する基本転写因子である *tbp* と、細胞骨格を構成する β アクチン、翻訳伸長因子 *eef1a1b*、また、近年内部標準としての有用性が認められてきた *ppia* を用いた[1]。また、t 検定を行い、 $p < 0.05$ のものを有意と判断した。

2. 抗体染色による発現領域の解析

生後 1.5 ヶ月と 5 ヶ月のキリフィッシュを 3 匹ずつの骨格筋の凍結切片を作製し、抗体染色を行った。ヒト *Zic1* に対する抗体 (Sigma 社) を用い、間接蛍光抗体法により染色した。観察は共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて行った。

3. knock-in-reporter 法による *zic1* の発現の可視化

キリフィッシュの *zic1* のプロモーター領域をターゲットとした gRNA を作製し、CRISPR/Cas9 法に基づき緑色蛍光タンパク質をコードする GFP 遺伝子のノックインを行った。作製した gRNA および GFP 発現コンストラクトをキリフィッシュ 1 細胞期卵にインジェクションした。ノックイン胚は蛍光実体顕微鏡を用いて観察を行った。先行研究で報告されているゼブラフィッシュやメダカの胚発生期の *zic1* 発現パターンに基づき、キリフィッシュにおける *zic1* の発現パターンが可視化できているかを確認した。

[結果]

1. RT-qPCR

まず若齢期の 1 個体のサンプルを基準として ΔCt 法で比較解析を行った。*fbxo32* の発現量は加齢で増加傾向が見られたが、有意な差は確認できなかった。一方、*zic1* の発現量は加齢に伴い有意に増加することを確認できた (図 2)。

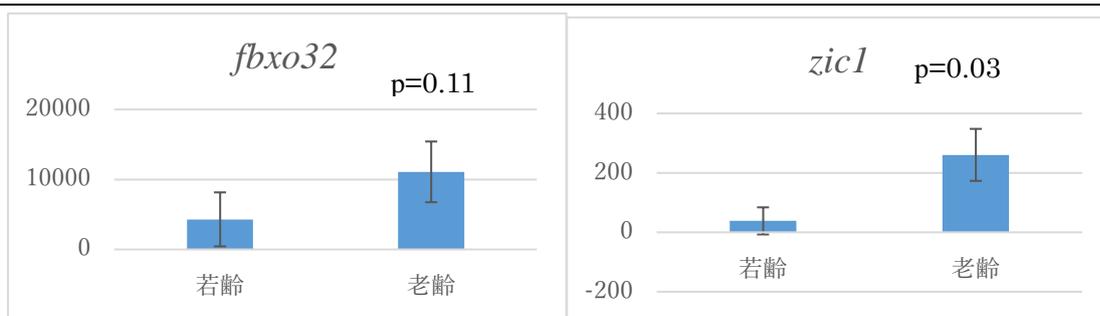


図2 若齢期と老齢期キリフィッシュの骨格筋における *fbxo32* と *zic1* の発現量

さらに、より正確な解析を行うために内部標準の検討を行った。しかし、今回解析した4種類の内部標準遺伝子のいずれにおいても、加齢に伴う発現量の増加が認められた(図3)。これらの結果は想定外ではあったが、一方で、加齢により総 RNA 量が増加したと仮定した場合、内部標準遺伝子発現が相対的に減少したように見えた可能性も考えられる。したがって、今後、加齢解析における内部標準としてどのような遺伝子が適しているか、慎重な検討が必要である。

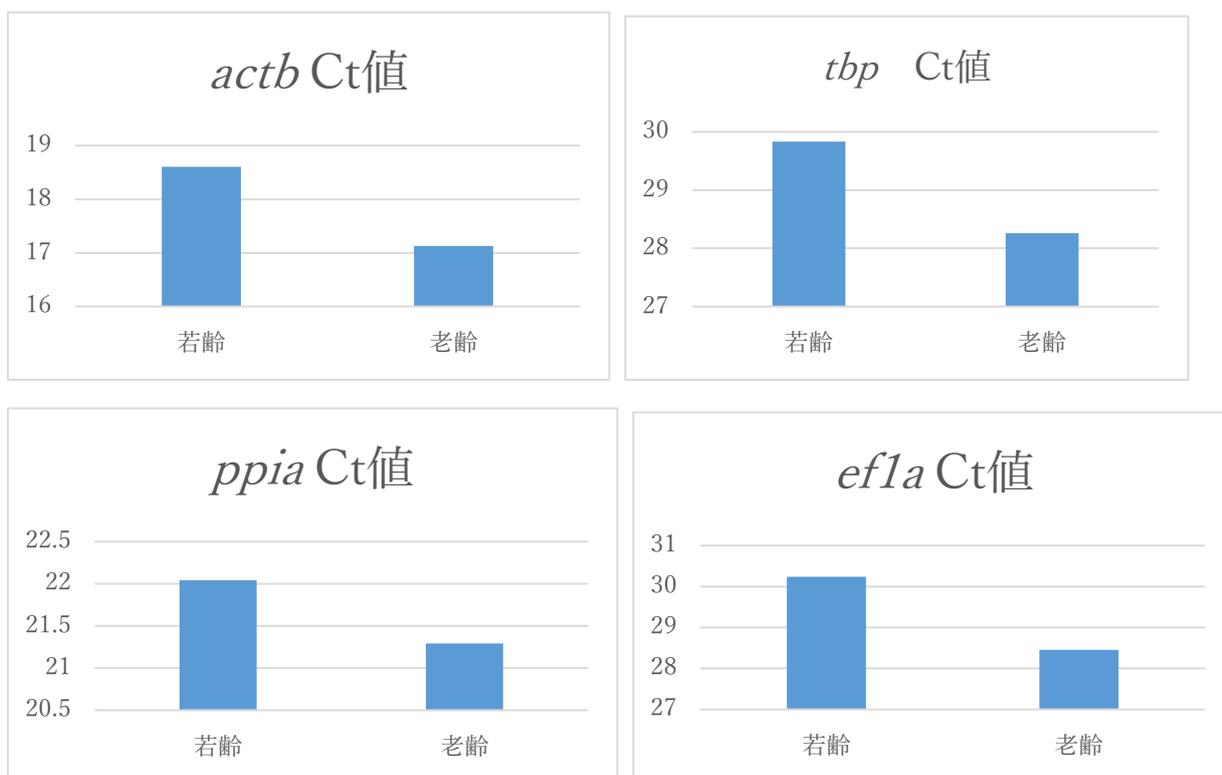


図3 老齢期と若齢期キリフィッシュの骨格筋における *actb*、*tbp*、*ppia*、*ef1a* の発現量

2. 抗体染色による発現領域の解析

キリフィッシュ骨格筋において *zic1* 発現量の加齢による増加が認められたので、続いて、*zic1* の発現が骨格筋のどの領域で加齢により変化するかを抗体染色により調べた。なお、本実験では、ヒト *Zic1* に対する抗体がキリフィッシュ *Zic1* に交差することを期待し、市販のヒト *Zic1* 抗体を用いた。

染色した切片を顕微鏡で観察したところ、明瞭なシグナルが見られず、わずかに見られたシグナルも自家蛍光のシグナルと一致していた。したがって、今回使用したヒト *Zic1* に対する抗体はキリフィッシュ *Zic1* には交差しなかったと考えられる。

3. knock-in-reporter 法による *zic1* の発現の可視化

抗体染色での *Zic1* 発現の検出が困難であったため、knock-in-reporter 法による *zic1* 発現の可視化を試みた。受精卵にインジェクションした後、1週間経過したものを観察すると、GFPのシグナルが神経管および、将来筋肉に分化する体節において発現する様子を観察できた(図4)。今後、この可視化システムを確立し、加齢による *zic1* の発現変化を調べていきたい。



図4 生後1週間のノックインレポーター法による *zic1* の発現可視化

[考察]

RNA-seqの結果と同様に、今回行った RT-qPCRの結果でも *fbxo32*、*zic1* の発現量は増加を確認できた。一方、加齢に伴う変化を正確に評価できる内部標準を特定することは出来なかった。RNA-seqの結果等を踏まえて今後さらに適した内部標準となる遺伝子を探索する必要がある。今回、*fbxo32* は筋萎縮に関わることが分かっている老化分子マーカーとして使用したが、若齢期と老齢期において発現量は増えていたものの有意な差はなかった。図1の *fbxo32* のRNAシーケンス結果より、4.5ヶ月と6ヶ月の間で mRNA 量が非常に増えているために、今回 qPCR を行った 1.5ヶ月と5ヶ月の間ではまだ増加量が少なく有意な差が出なかったと考えられる。次に、*zic1* の発現量増加に対する考察を行う。筋肉に生じる一部のがん化組織では *zic1* が高発現していることが分かっている[2]。したがって、*zic1* の発現量が増えることでがんが出来やすくなり死亡率が高まる、つまり老化が促進すると考えられる。また、*zic1* による老化制御を今後明らかにしていくためには、加齢した筋肉組織において *zic1* がどのような遺伝子群の転写制御を行っているかを明らかにしていく必要があるだろう。興味深いことに、ラット骨格筋の加齢に伴う遺伝子発現変化を解析した先行研究のデータベースを参照したところ、ラットにおいても老齢期になると *zic1* の発現量が増えていた。これによりキリフィッシュだけではなく哺乳類においても *zic1* の発現量が増えることが分かる[3]。ゆえに、骨格筋における、加齢に伴う *zic1* の発現量増加はヒトの老化にも繋がる新たな老化制御機構である可能性が高い。

3の実験において、*zic1* が筋肉に沿って発現する様子が可視化できていた。今回は時間が足りなかったが、今後は老化が進んだ際の *zic1* の発現場所も観察していきたい。

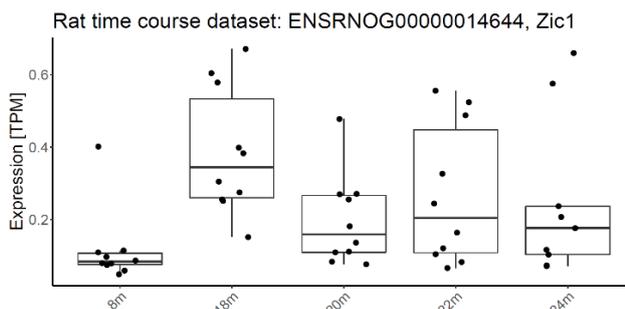


図5 ラット骨格筋における *zic1* の発現量の変化

参考文献

- [1] Huan Gong, Liang Sun, Beidong Chen, et al. (2016). Evaluation of candidate reference genes for RT-qPCR studies in three metabolism related tissues of mice after caloric restriction
- [2] Elliott Brill, Ryan Gobble, Christina Angeles, et al. (2010). ZIC1 Overexpression Is Oncogenic in Liposarcoma. Cancer Research Volume 70, Issue 17.
- [3] Ham, D. J. et al. (2020) The neuromuscular junction is a focal point of mTORC1 signaling in sarcopenia. Nat. Commun. 11, 1-21