

(様式 3)

平成22年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

研究テーマ名称	皮膚感覚に基づいた反射運動の発達における糖タンパク質輸送系の役割の解明
応募事業区分	若手研究者研究支援事業
申請代表者氏名	浅川和秀

○ 研究状況報告

本研究は、脊椎動物に保存された反射運動をモデルに用いて、動物の動物たる所以である「個体運動」の発達メカニズムを、分子レベルで理解するという長期的な目標に基づいて開始された。

本研究の申請に先立って、進化的に保存された糖タンパク質輸送制御因子の変異によって反射運動に異常を示すゼブラフィッシュ変異体を既に取得していた。個体運動の発達メカニズムを糖タンパク質輸送と関連づけて理解するためには、まず第一に、変異の原因遺伝子 *lman21a* が機能する組織を同定することが重要であった。しかし、発現量が従来の組織染色法の検出限界以下であるために、*lman21a* が発現する組織を特定できない、という状況にあった。

本研究は、このような状況を打破する為に、*lman21a* を人為的に発現させると *lman21a* 変異体の運動異常が正常なものへと回復する組織を特定することで、*lman21a* が機能する組織を同定する、という提案であった。

本研究は当初の計画通りに着実に実施され、脳幹と呼ばれる特異的な脳領域において *lman21a* が機能することが実証された。この成果は、脳幹における糖タンパク質輸送が個体運動の発達に重要である、という今までに無いユニークな視点をもたらした。

今後は、脳幹において *lman21a* による輸送制御を受け、尚かつ、個体運動の発達に必要な糖タンパク質の実体を明らかにすることが重要である（新規の研究提案として平成23年度若手研究者研究支援事業に申請中）。

○ 当該事業年度において達成された研究成果

【Gal4-UAS:*lman21a* 遺伝子発現システムの構築】

Gal4 トラップ法によって、組織特異的に酵母転写因子 Gal4 を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュをスクリーニングした。その結果、組織特異的な Gal4 系統を 20 樹立した。また、Gal4 の標的配列 (UAS) の下流に *lman21a* を連結させたコンストラクトを作製し、Gal4 によって *lman21a* の発現を誘導できる UAS-*lman21a* トランスジェニック系統を樹立した。

【モルフォリノオリゴヌクレオチドによる *lman21a* の機能阻害】

lman21a の mRNA に対するモルフォリノオリゴヌクレオチド (*lman21a* MO) を作製した。*lman21a* MO を胚に注入することにより、運動異常が起こることを確認した。*lman21a* MO の注入による *lman21a* の機能阻害では、運動異常表現型が一過性であり、遺伝子治療実験の正否を判定するには適さないことが分かった。したがって、*lman21a* MO 胚に対してではなく、*lman21a* 変異ホモ接合体に対して遺伝子治療実験を実施することにした。

【*lman21a* ホモ接合体の運動異常の遺伝子治療実験】

lman21a-mutation (ヘテロ) ;細胞種特異的-Gal4;UAS-*lman21a* の3重トランスジェニック系統と *lman21a*-mutation (ヘテロ) 系統を掛け合わせ、細胞種特異的に *lman21a* を発現する *lman21a*-mutation (ホモ) ;細胞種特異的-Gal4;UAS-*lman21a* の4重トランスジェニック胚を取得し、運動異常が正常に回復したか否かを検討した。脳幹特異的に発現する *cyp26c1* 遺伝子の活性を利用して Gal4 を発現する系統を用いて実験を行なったところ、機械刺激に向かって逃避運動をするという異常な運動が、機械刺激から離れる方向に逃避運動をするという正常なものへ変化した。この結果は、脳幹における *lman21a* の機能が逃避運動に必要なことを示している。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付) 無し

(様式 3)

平成23年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

研究テーマ名称	調和のとれた体幹運動に必要な脳幹における糖タンパク質輸送システムの解明
応募事業区分	事業枠②若手研究者支援
申請代表者氏名	浅川和秀

○ 研究状況報告

私は、平成22年度若手研究者研究支援事業の支援によって、脊椎動物に保存された糖鎖結合タンパク質 VIPLa/Lman21a が、脳幹による体幹運動制御に必要であることを示した。本年度は、この研究成果を発展させるべく、新規の研究テーマとして、VIPLa を介した細胞内輸送制御をうける糖タンパク質を同定し、その機能を解析することで体幹運動の制御メカニズムを分子レベル理解することを目指した。しかしながら、研究期間内にゼブラフィッシュ胚の抽出液から VIPLa を精製することは達成できず、目的の糖タンパク質の同定には至らなかった。達成に至らなかった大きな原因は VIPLa の発現量が微量であることが考えられる。そのため、目的の糖タンパク質を VIPLa に結合する因子として単離することは困難であると予想された。改善策として、VIPLa 変異体において分泌が減少している糖タンパク質を同定するアプローチが有効であると考えて、現在この戦略にもとづいて実験中である（平成24年度若手研究者研究支援事業、新規課題として申請中）。また、細胞学的、解剖学的解析から、VIPLa の生理機能について重要な知見が得られた。

○ 当該事業年度において達成された研究成果

【脳幹神経の発生における VIPLa の機能評価】VIPLa 変異体の脳幹神経細胞を解剖学的に解析した。その結果、体幹運動に関連する主要な脳幹神経細胞の形態や、軸索の走行パターンには変化が見られなかった。この結果は、VIPLa がこれまでに知られていない作用機序によって、体幹運動に関与している可能性を示唆しており、興味深い。

【VIPLa の細胞内局在の解析】VIPLa が、細胞内小器官ゴルジ体に主に局在していることを見いだした。この性質はヒト VIPL と一致しており、ゼブラフィッシュとヒトにおいて VIPLa が進化的に保存された機能を有しているという考えを支持する。

【VIPLa と VIPLb の機能の比較】アミノ酸配列が80%以上同一なパラログ VIPLb の機能解析を行ない、VIPLb の機能阻害では体幹運動の異常が誘発されることが分かった。この結果は、VIPLa によって特異的に認識され、かつ体幹運動に必要な糖タンパク質が存在することを示唆する。

【VIPLa 抗体作製】VIPLa、VIPLb の解析に必要なポリクローナル抗体を作製した。VIPLa、VIPLb の細胞生物学的解析、生化学的解析が進展する期待される。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト（論文があれば添付）
無し