

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18500233

研究課題名（和文） 総腓骨神経の走行に異常を示す変異マウスの原因遺伝子の同定

研究課題名（英文） Genome analysis of a spontaneous mutant mouse with a motor axon guidance defect

研究代表者

榊 和子 (KEINO-MASU KAZUKO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：50344883

研究成果の概要:総腓骨神経の走行異常により先天的に腓骨筋が萎縮する変異マウスについて、連鎖解析を行い、その原因遺伝子がゲノム中約 1.1Mbp の領域内に存在することを明らかにした。さらに、その範囲内に存在が予想される転写産物の総てのエクソン並びにエクソン/イントロンの境界部分について、変異マウスと野性型マウスの塩基配列の比較を行った。フレームシフトやナンセンス変異等は見られず、それ以外の遺伝子変異に起因する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	630,000	4,230,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：脳・神経、遺伝子、発生・分化、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

発生時期に神経回路網を作る際、神経軸索は周囲の様々な誘引性分子と反発性分子の相互作用によって誘導され、正しい標的細胞へ到達すると考えられている。近年、脊髄交連神経を腹側正中へと誘引する軸索ガイダンス蛋白「ネトリン」とその受容体を始め、Semaphorin とその受容体 Neuropilin, Plexin, Slit とその受容体 Robo, Ephrin と受容体 Eph 等が相次いで同定されてきた。脊髄運動神経は発生期に特定の筋へと投射するため、何らかのガイダンス分子が機能していると考えられるが、その仕組みについて

は明らかではない。

運動神経の軸索ガイダンス研究は、Lynn Landmesser (米国、Case Western Reserve 大学) がニワトリ胚を用いた移植実験により、標的である筋肉(付近)に何らかの手がかりがあることを示唆する結果を示した (Lance-Jones and Landmesser, 1981) ことが発端となっているが、その分子の実体は不明である。

これまでの関連する研究では、例えば Thomas M. Jessell (米国、コロンビア大学) は、複数の転写因子発現の時間的空間的組み合わせにより、運動神経の個性が獲得される

ことを示している。また、転写因子により調節される遺伝子の候補として、カドヘリンのファミリーが考えられている。いくつかの転写因子の遺伝子欠損マウスでは、細胞の位置の異常や、神経終末の形態異常、筋紡錘からの運動神経へのシナプスの異常などが見られているが、支配筋への投射はいずれも正常に保たれていた (Arbor et al., 2000, Kania et al., 2000)。

Patrick Charnay (フランス、国立健康医学研究所) は、EphA4 の遺伝子欠損マウスにおいて、後肢領域の運動神経にガイダンス異常の表現型が見られることを発表している (Helmbacher et al., 2000)。しかしながら、別のグループが作成した EphA4 の遺伝子欠損マウスでは、脳での表現型は一致するものの、後肢の表現型は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究で解析するマウスは自然発生の突然変異マウスで、先天的な腓骨筋の萎縮が見られ、その原因は、発生期に総腓骨神経が腓骨筋に投射しないためであると考えられている。このマウスでは、特定の運動神経投射のみに異常が見られることから、運動神経の軸索ガイダンスの分子機構を解明する上で有用なモデル動物になると考えられる。

上記の Charnay らの報告では、ヘテロマウスでも遺伝子欠損マウスの半分程度の割合で表現型が見られるとされており、劣性遺伝形式で表現型が観察される本変異マウスとは、表現型の発現する機構が異なると考えられる。

この研究では、本変異マウスの原因遺伝子を同定することを目的とし、それにより運動神経軸索ガイダンスに関与する新たな分子、新たな軸索ガイダンス機構の発見を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 連鎖解析

変異マウスを C57BL6/J 系統に 3 代交配したマウス (N3) を用いて連鎖解析を行った。連鎖解析に際し、既知のマイクロサテライトマーカーに加え、新たにマイクロサテライトマーカーをデザインし、スクリーニングにより系統差が検出可能なマーカーを作成した。数種の純系マウス (C57BL6/J、A/J、FvB/N 等) との交配を行ったが、連鎖解析は主に C57BL6/J 用いて行った。また、表現型は劣性遺伝するが遺伝子の浸透度が 100% ではないため、表現型が表出する個体のみを用いた。

(2) 候補領域内に存在が予想される遺伝子の塩基配列の解析

連鎖解析により得られた候補遺伝子領域に関して、NCBI (セセラ社を含む) のデータベ

ースを参照し、その範囲内に存在が予想される転写単位 (遺伝子) について解析した。変異マウスと正常マウス間の塩基配列の比較は以下のように行った。各遺伝子で予想される全てのエクソンについて、エクソン/イントロンの境界を含むエクソン部分を PCR で増幅し、その DNA 断片を直接塩基配列の決定に用いた。塩基配列の比較には、変異型として、オリジナルの変異マウス (近交系 CF-1 由来) と C57BL/6J に 3 代戻した変異マウス (N3) の 2 系統のゲノムを、コントロールとして C57BL/6 (B6) と 129/SvJ (129) の純系 2 系統のゲノムを用い、必ず 4 種類を並行して実験操作を行った。塩基配列に違いが認められた場合には、他の純系マウス系統 (FvB/N, A/J, Balbc 等) のゲノムを用いて確認し、マウスの系統による差異である可能性を検討した。

4. 研究成果

連鎖解析の進行に伴い範囲から外れたものも含め、合計 22 遺伝子、244 エクソンについて解析を行った。イントロン内の 1 塩基置換や塩基の欠失挿入などが 195 カ所、エクソン内の 1 塩基置換や塩基の欠失挿入が 79 カ所、アミノ酸の変化を伴う置換が 21 カ所存在した。しかしながら、欠失、フレームシフト、truncation など、直ちにタンパクの機能異常を引き起こす原因となりうる変異はなかった。またアミノ酸の変化を伴う置換 21 カ所のうち 15 カ所はマウスの系統による差異であることが確認された。

今後、変化するアミノ酸によるタンパク機能の違いが有るか否かの検討をすると共に、プロモーター、エンハンサー領域の変化による遺伝子発現の変化、non-coding RNA の存在なども視野に入れて解析を進める必要があると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Hatanaka, Y., Matsumoto, T., Yanagawa, Y., Fujisawa, H., Murakami, F., Masu, M. Distinct Roles of Neuropilin 1 Signaling for Radial and Tangential Extension of Callosal Axons., *Journal of Comparative Neurology*, 514, 215-225, 2009 査読有
- ② Ikeuchi, Y., Stegmüller, J.,

- Netherton, S., Anh Huynh, M., Masu, M., Frank, D., Bonni, S., and Bonni, A. A SnoN-Ccd1 Pathway Promotes Axonal Morphogenesis in the Mammalian Brain. *J. Neurosci.*, 29, 4312-4321, 2009 査読有
- ③ Aiba, A., Inokuchi, K., Ishida, Y., Itohara, S., Kobayashi, K., Masu, M., Mishina, M., Miyakawa, T., Mori, H., Nakao, K., Obata, Y., Sakimura, K., Shiroishi, T., Wada, K., Yagi, T. Mouse liaison for integrative brain research. *Neurosci. Res.* 58, 103-104, 2007. 査読有
- ④ Okada, T., Keino-Masu, K., and Masu, M. Migration and nucleogenesis of mouse precerebellar neurons visualized by in utero electroporation of a green fluorescent protein gene. *Neurosci. Res.* 57, 40-49, 2007. 査読有
- ⑤ Kamimura, K., Koyama, T., Habuchi, H., Ueda, R., Masu, M., Kimata, K., and Nakato, H. Specific and flexible roles of heparan sulfate modifications in Drosophila FGF signaling. *J. Cell Biol.* 174, 773-778, 2006. 査読有
- ⑥ Takayanagi, S., Hiroshima, T., Yamazaki, S., Nakajima, T., Morita, Y., Usui, J., Eto, K., Motohashi, T., Shiomi, K., Keino-Masu, K., Masu, M., Oike, Y., Mori, S., Yoshida, N., Iwama, A., and Nakauchi, H. Genetic marking of hematopoietic stem and endothelial cells: Identification of the Tmtsp genes encoding a novel cell-surface protein with the thrombospondin-1 domain. *Blood* 107, 4317-4325, 2006. 査読有
- ⑦ Soma, K., Shiomi, K., Keino-Masu, K., and Masu, M. Expression of mouse Coiled-coil-DIX1 (Ccd1), a positive regulator of Wnt signaling, during embryonic development. *Gene Exp. Patterns* 6, 325-330, 2006. 査読有
- ⑧ Koike, S., Keino-Masu, K., Ohto, T., and Masu, M. The N-terminal hydrophobic sequence of autotaxin (ENPP2) functions as a signal peptide. *Genes Cells*, 11, 133-142, 2006. 査読有
- [学会発表] (計 31件)
1. Koike, S., Keino-Masu, K., Ohto, T., Sugiyama, F., Takahashi, T., and Masu, M. Autotaxin-mediated Control of Actin Dynamics through Rho-ROCK-LIM kinase Pathway is Required for Endocytic Vesicle Fusion and Lysosome Biogenesis in Yolk Sac Visceral Endoderm Cells. The 48th annual meeting of the American Society for Cell Biology., 2008年12月13-17日, San Francisco, USA
 2. 榎正幸, 岡田拓也, 長嶺聖史, 塩見健輔, 丹波道子, 石嶺久子, 大戸達之, 國田智, 高橋智, 榎和子, 「神経発生におけるヘパラン硫酸エンドスルファターゼの役割」第51回日本神経化学会大会, 2008年9月11-13日, 富山国際会議場
 3. 榎正幸, 丹波道子, 長嶺聖史, 石嶺久子, 大戸達之, 國田智, 高橋智, 榎和子 「ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ欠損マウス臓器におけるヘパラン硫酸二糖解析」第28回日本糖質学会年会, 2008年8月18-20日, つくば国際会議場
 4. 岡田拓也, 榎和子, 長嶺聖史, 國田智, 高橋智, 榎正幸 「ヘパラン硫酸 6-O-エンドスルファターゼは正常な神経回路形成に必要である」第28回日本糖質学会年会, 2008年8月18-20日, つくば国際会議場
 5. 榎和子, 岡田拓也, 塩見健輔, 長嶺聖史, 丹波道子, 石嶺久子, 大戸達之, 國田智, 高橋智, 榎正幸 「エンドスルファターゼによるヘパラン硫酸リモデリングと生体シグナル制御」第28回日本糖質学会年会, 2008年8月18-20日, つくば国際会議場
 6. 畠中由美子, 松本智子, 柳川右千夫, 藤澤肇, 村上富士夫, 榎正幸 「大脳皮質交連神経伸長におけるニューロピリン1の機能解析」第31回日本神経科学大会 2008年7月9-11日, 東京国際フォーラム
 7. 塩見健輔, 桑野剛英, 榎和子, 榎正幸 「ゼブラフィッシュ sulfFP 遺伝子の機能解析」第31回日本神経科学大会 2008年7月9-11日, 東京国際フォーラム
 8. 岡田拓也, 榎和子, 長嶺聖史, 國田智, 高橋智, 榎正幸 「SulfFP欠損マウスの表現型回復実験」第31回日本神経科学大会 2008年7月9-11日, 東京国際フォーラム

9. 梶正幸、村上さおり、岡田拓也、梶和子「グリピカンとシンデカン遺伝子のマウス胎児脳における発現」第31回日本神経科学大会 2008年7月9-11日、東京国際フォーラム
10. Masu, M., Okada, T. Nagamine, S., and Keino-Masu, K. Heparan sulfate endosulfatases are required for normal brain development. 17th Biennial meeting of the International Society for Developmental Neuroscience 2008年6月1-4日, Asilomar, CA, USA
11. 梶和子、長嶺聖史、丹波道子、石嶺久子、大戸達之、國田智、高橋智、梶正幸「ヘパラン硫酸 6-O-エンドスルファターゼ欠損マウスにおけるヘパラン硫酸組成」第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、2007年12月11-15日、パシフィコ横浜
12. 梶和子「新規のエンドスルファターゼ SulfFPによるヘパラン硫酸糖鎖修飾の生理機能の解明」第5回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、2007年11月26-27日、品川、東京コンファレンスセンター
13. Seiichi Koike, Kazuko Keino-Masu, Masayuki Masu. “Expression and functional roles of autotaxin in mouse nervous system” The 37th Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2007年11月3-7日, San Diego, convention center, USA
14. Takuya Okada, Kazuko Keino-Masu, Masayuki Masu. “Electroporation-based analysis of signaling molecules regulating migration and necleogenesis” The 37th Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2007年11月3-7日, San Diego, convention center, USA
15. 岡田拓也、梶和子、梶正幸「小脳に投射する三叉神経脊髄路核神経細胞の起源と発生」第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会 2007年9月10-12日、パシフィコ横浜
16. 塩見健輔、桑野剛英、梶和子、梶正幸「ゼブラフィッシュ胚発生における SulfaaseFP3 遺伝子の機能解析」第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会 2007年9月10-12日、パシフィコ横浜
17. Yasue Horiuchi, Hiroki Ishiguro, Minori Koga, Toshiya Inada, Tatsuyuki Muratake, Toshiyuki Someya, Kazuko Keino-Masu, Masayuki Masu, Tadao Arinami 「Association study of the sulfatase 1 (SULF1) gene and bipolar disorder」第29回日本生物学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会 2007年7月11-13日、札幌コンベンションセンター
18. 小池誠一、梶和子、大戸達之、杉山文博、高橋智、梶正幸「Autotaxin はマウス臓側内胚葉細胞の小胞輸送を制御する」第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会 2007年5月28-30日、福岡国際会議場
19. 塩見健輔、長嶺聖史、岡田拓也、梶和子、梶正幸「ヘパラン硫酸修飾酵素 SulfFPによる形態形成制御」第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会 ミニシンポジウム「細胞外マトリックスによる細胞運命制御」第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会 2007年5月28-30日、福岡国際会議場
20. Kensuke Shiomi, Kazuko Keino-Masu, and Masayuki Masu 「Functional analysis of the type A coiled-coil-DIX proteins」The 8th AEARU Joint Workshop on Life Science 2006年11月4-6日、つくば国際会議場
21. Takuya Okada, Kazuko Keino-Masu, and Masayuki Masu 「Migration and nucleogenesis of mouse precerebellar neurons visualized by in utero electroporation of a green fluorescent protein gene」The 8th AEARU Joint Workshop on Life Science 2006年11月4-6日、つくば国際会議場
22. Kazuko Keino-Masu and Masayuki Masu 「An anatomical study of a spontaneous mutant, PMA mouse」The 8th AEARU Joint Workshop on Life Science 2006年11月4-6日、つくば国際会議場
23. Seiichi Koike, Kazuko Keino-Masu, Tatsuyuki Ohto, Fumihiko Sugiyama, Satoru Takahashi, and Masayuki Masu 「Functional characterization of an exoenzyme autotaxin in the mouse early development」The 8th AEARU Joint Workshop on Life Science 2006年11月4-6日、つくば国際会議場

24. 榎正幸「神経発生を制御するヘパラン硫酸エンドスルファターゼの働き」第6回神経組織プロテオグリカン研究会 2006年7月22日、京都工芸繊維大学
25. 塩見健輔、榎和子、榎正幸
「Coiled-coil-DIX A タンパク質の機能解析」第29回日本神経科学大会 2006年7月19-21日、京都国際会館
26. 鈴木雄策、塩見健輔、田村剛一郎、内田博、榎和子、榎正幸「ゼブラフィッシュスルファターゼ SulfFP3 の単離と解析」第29回日本神経科学大会 2006年7月19-21日、京都国際会館
27. 石橋紀世、榎和子、大戸達之、國田智、高橋智、榎正幸「ヘパラン硫酸 6-エンドスルファターゼ SulfFP1 欠損マウスにおける小脳発達」第29回日本神経科学大会 2006年7月19-21日、京都国際会館
28. 岡田拓也、長嶺聖史、榎和子、大戸達之、國田智、高橋智、榎正幸「ヘパラン硫酸 6-エンドスルファターゼは脳の正常な発生に必要なものである」第29回日本神経科学大会 2006年7月19-21日、京都国際会館
29. 榎和子、岡本武人、首藤文洋、山崎信幸、宮川剛、大戸達之、國田智、高橋智、永雄総一、榎正幸「ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ SulfFP1 欠損マウスにおける運動学習」第29回日本神経科学大会 2006年7月19-21日、京都国際会館
30. 榎和子、岡本武人、首藤文洋、山崎信幸、宮川剛、大戸達之、國田智、高橋智、永雄総一、榎正幸「ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ SulfFP1 欠損マウスにおける運動学習」第29回日本神経科学大会のサテライトシンポジウム“Mouse genetical manipulations as tools for understanding brain function” 2006年7月18日、京都、平安神宮会館
31. Seiichi Koike, Kazuko Keino-Masu, Tatsutyuki Ohto, Fumihiro Sugiyama, Satoru Takahashi, Masayuki Masu
「Autotaxin is essential for blood vessel formation」20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (第79回日本生化学会大会・第29回日本分子生物学会年会) 2006年6月18-23日、京都国際会館

- ① Keino-Masu, K. and Masu, M. Heparan sulfate endosulfatase assay. In: Experimental Glycoscience (ed. by N. Taniguchi et al.), Springer-Verlag, pp. 123-124, 2008. Total pages 498
- ② Masu, M. and Keino-Masu, K. Role of heparan sulfate 6-O-endosulfatases in the nervous system. In: Neural Proteoglycans (ed. by N. Maeda), Kerala, India, Research Signpost, pp. 103-114, 2007. (total 281 pages)

〔その他〕
ホームページ
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/molneurobiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎 和子 (KEINO-MASU KAZUKO)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
研究者番号：50344883

(2) 研究分担者

榎 正幸 (MASU MASAYUKI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：20243032
塩見 健輔 (SHIOMI KENSUKE)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
研究者番号：00311598