

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590197

研究課題名 (和文) VAMP3 を介した GPI アンカー型蛋白質の細胞内輸送機構
に関する分子解剖学的解析研究課題名 (英文) Molecular anatomy of traffic of TEX101, a GPI-anchored protein,
via VAMP3

研究代表者

瀧澤 敬美 (TAKIZAWA TAKAMI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：40386157

研究成果の概要：生殖細胞に特異的に発現している GPI-アンカー型蛋白質である TEX101、およびその細胞内輸送関連分子 VAMP3 の機能解析のためのバイオイメージング技術の開発と、それを用いた分子解剖学的解析を行った。TEX101 関連分子の GFP 融合発現ベクター、および TEX101 をノックダウンする GFP 融合 shRNA ベクターを作製した。マウス精巣を用いて、エレクトロポレーションによる遺伝子導入の詳細な検討を行い、生殖細胞への良好なベクター導入に成功し、新しい in vivo 遺伝子導入技術の開発に結びついた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：組織細胞化学、TEX101、VAMP3、エレクトロポレーション

1. 研究開始当初の背景

Glycosylphosphatidylinositol(GPI) を介して細胞膜に結合している GPI(アンカー型)蛋白質は、真核生物において広く分布し、100 種類以上の分子が同定されており、その機能は多種多様にわたっている。臨床医学においても、最近では狂牛病の分子病態に深く関わりを持っており、注目を集めている。GPI 蛋白質は小胞体で GPI アンカーと結合し生合成され、ゴルジ装置を経て細胞膜表面に輸送されるが、細胞膜へどの様に輸送されるのか、そ

の詳細は不明である。

我々が新規に同定した生殖細胞に特異的に発現している GPI 蛋白質、TEX101 の研究から、その共役分子が vesicle associated membrane protein (VAMP)-3 である新知見を得た。VAMPs は、特に神経細胞で、シナプス小胞上の v-SNARE として開口分泌に重要な役割を担っている分子として報告され、VAMP3 は神経細胞以外の小胞上のテタヌス神経毒感受性 v-SNARE と考えられているが、細胞内輸送における特異的機能は不明なま

までである。GPI 蛋白質の細胞内輸送と関連する報告は今までなく、GPI 蛋白質を細胞膜へ輸送する特異的 v-SNARE の有力な候補が VAMP3 である可能性を強く示唆している。GPI 蛋白質の細胞膜への輸送機構を解明する大きな手掛かりであると考えられる。

2. 研究の目的

今回の基盤研究により、TEX101 および VAMP3 の機能解析のための先端のバイオイメージング手法の開発と、それを用いた分子解剖学的解析を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

VAMP3 に EGFP 誘導タンパク質を融合させた VAMP3-EGFP、TEX101 に赤色蛍光蛋白質(rhodamine fluorescence protein, RFP)を融合させた TEX101-RFP を作製、導入し、VAMP3 と TEX101 の可視化を行った。

次に、TEX101 を標的とする short hairpin RNA を設計(EmGFP 付きベクター(Invitrogen社)を用いて shTEX101 を作製)、抑制効果を定量的 PCR 解析等により検証した。さらに、生殖細胞に導入し、shRNA(shTEX101)によるノックダウンによる機能解析を行った。

4. 研究成果

作製した VAMP3-EGFP、TEX101-RFP を COS-7 細胞を導入することにより、その発現を安定して検証することが可能となった。しかし、マウス単離生殖細胞の初代培養系へのベクターのトランスフェクション効率が著しく低かった。ベクターの再検討(pCAGGS ベクター(大阪大学・宮崎純一教授より分与)等)を行ったが、ベクターの変更によっても導入高率は改善せず、マウス生殖細胞は、培養細胞用のトランスフェクション試薬(例:リポフェクトアミン等)による導入が非常に難し細胞であることが判明した。

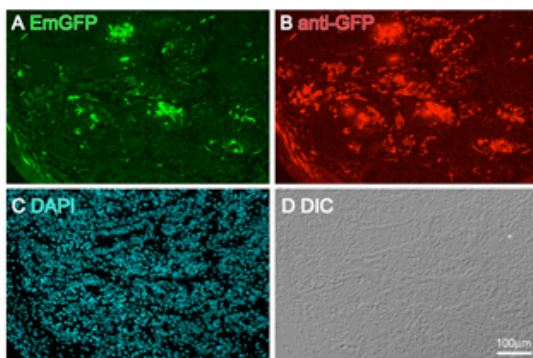


図1 生後10日目のマウス精巣にエレクトロポレーション法で EmGFP-shRNA(shLacZ)ベクターを導入した3日後の組織切片像。A: EmGFP 像。B: 抗 GFP 抗体による免疫染色像。C: DAPI 像。D: DIC 像。

そこで、エレクトロポレーション法による導入の検討を行った。精子形成開始時期にあたる新生仔期の精巣を用いて、in vivo レベルでのエレクトロポレーションによる遺伝子導入の詳細な検討を行った(図1)。比較的高めの低電圧(40V)による極短時間(5-10 ms)のエレクトロポレーションをおこなった後、引き続き低電圧(20V)でエレクトロポレーションをおこなうことにより、生殖細胞への良好な導入に成功し、新しい精巣内への in vivo 遺伝子導入技術の開発に結びついた(成果は投稿準備中)。現在、導入した精巣の詳細な形態解析、VAMP3 等の輸送関連分子の動態解析を進めている。

精巣初代培養系へベクターを導入し、生殖細胞における TEX101、VAMP3 等の分子の詳細なリアルタイムバイオイメージング解析が課題として残された。

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 4 件)

1. John M Robinson, Toshihiro Takizawa. Correlative Fluorescence and Electron Microscopy in Tissues: Immunocytochemistry. J Microsc (in press), 2009. (査読有り)

2. Takuya Mishima, Takami Takizawa, Shan-Shun Luo, Osamu Ishibashi, Yutaka Kawahigashi, Yoshiaki Mizuguchi, Tomoko Ishikawa, Miki Mori, Tomohiro Kanda, Tadashi Goto, Toshihiro Takizawa. MicroRNA (miRNA) cloning analysis reveals sex differences in miRNA expression profiles between adult mouse testis and ovary. Reproduction 136 (6): 811-811, 2008. (査読有り)

3. Yoshiaki Mizuguchi, Shigeki Yokomuro, Takuya Mishima, Yasuo Arima, Tetsuya Shimizu, Yutaka Kawahigashi, Toshihiro Takizawa, Takashi Tajiri. Therapeutic use of short hairpin RNA in acute liver failure. J Nippon Med Sch 74: 74-76, 2007. (査読有り)

4. Hiroki Tsukamoto, Toshihiro Takizawa, Kenji Takamori, Hideoki Ogawa, Yoshihiko Araki. Genomic organization and structure of the 5'-flanking region of the TEX101 gene: alternative promoter usage and splicing generate transcript variants with distinct 5'-untranslated region. Mol Reprod Dev 74: 154-162, 2007. (査読有り)

[学会発表](計 1 件)

1. 瀧澤 俊広、小菅 拓治、原田 明希摩、

森 美貴、石橋 幸、瀧澤 敬美、荒木 慶彦、佐藤陽子、菱川善隆、小路武彦. RNAiによるマウス精巣 *Tex101* に関する *in vivo* ノックダウン解析：ベクターの作製とエレクトロポレーションによる精巣への導入条件検討. 第 49 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2008 年 10 月 5 日. 長崎.

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀧澤 敬美 (TAKIZAWA TAKAMI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：40386157

(2)研究分担者

瀧澤 俊広 (TAKIZAWA TOSHIHIRO)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90271220

(3)連携研究者

石川 朋子 (ISHIKAWA TOMOKO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：70212850

三嶋 拓也 (MISHIYA TAKUYA)

日本医科大学・大学院医学研究科・特別研究生

研究者番号：00398877