

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570195

研究課題名 (和文) 血管・神経のネットワーク形成に異常を引き起こすゼブラフィッシュ変異系統の解析

研究課題名 (英文) Analysis of neural and blood vessel network development in zebrafish mutant

研究代表者

東海林 互 (SHOJI WATARU)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：40250831

研究成果の概要 (和文)：

血管・神経のネットワーク形成に異常を引き起こすゼブラフィッシュ変異系統のポジショナル・クローニングを行い、コレステロール合成系路の異常が神経と血管の両者に発生異常をもたらすことを明らかにした。さらにこの経路上の代謝産物の解析から、代謝中間体より派生するゲラニル・ゲラニル産物の存在が血管の発生に必須であることを見だし、これによってプレニル化を受ける *rab* ファミリー遺伝子群が血管の発生に重要な役割を持つことを発見した。ゼブラフィッシュの *rab* ファミリー遺伝子をクローニングし、それぞれについて GTP 結合部位に変異を持つドミナント・ネガティブ体を作製して血管内皮細胞に発現させたところ、エンドサイトーシスに関連する機能を持つグループで、変異体と同様の異常を再現することができた。

研究成果の概要 (英文)：

We identified zebrafish mutant that has defect in blood vessels and neural network development. The mutated gene encodes an enzyme on cholesterol synthesis, and geranyl-geranyl products, which derive from intermediate metabolite of this pathway, was proved to be essential for blood vessels and neural development. Prenyl modification activates numbers of small G proteins, and we found *rab* family members are important in blood vessel development. We are further investigating what and how specific members of this gene family are involved in blood vessel development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000 円	390,000 円	1,690,000 円
2009 年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
2010 年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
年度			
年度			
総計	3,700,000 円	1,110,000 円	4,810,000 円

研究代表者の研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物学・発生生物学

キーワード：器官形成・神経・血管

1. 研究開始当初の背景

臓器・組織に脳からの指令を伝える神経系と酸素や栄養を運ぶ血管系は目的が異なるものの、どちらも体のすみずみまでネットワークをはりめぐらせる器官である。私たちは以前の研究により、神経軸索の方向を定める細胞外シグナル因子セマフォリン・ファミリーが、血管ネットワークの形成にも関与することを報告した。当時、両者のネットワーク形成には類似する点の多いことで注目を集めていたが、この研究は神経軸索ガイド因子の多くが血管形成に関与することを示す一連の報告のさきがけとなった。

2. 研究の目的

血管系と神経系の双方に欠損のあるゼブラフィッシュ変異体の解析を起点とし、両者の発生・発達メカニズムにおける共通の分子機構を明らかにすることによって、ネットワーク形成に新しい着眼点をもたらすことを目的とした。

3. 研究の方法

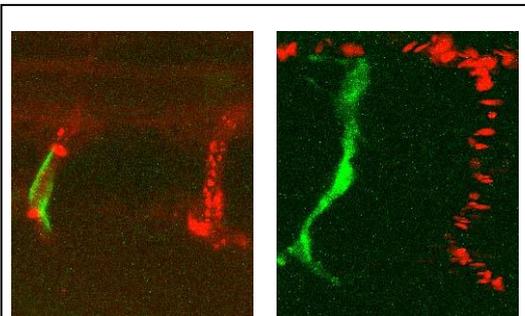
- (1) これまでに同定した血管系と神経系の双方に異常を引き起こすゼブラフィッシュ変異体の原因遺伝子をクローニングした。
- (2) 次にクローニングした遺伝子産物の果たす分子機能を明らかにし、その神経・血管の発生過程における役割を明らかにした。

4. 研究成果

- (1) まず血管・神経のネットワーク形成に異常を引き起こすゼブラフィッシュ変異系統のポジショナル・クローニングを行い、そのうちの1つの系統でコレステロール合成系路の異常が神経と血管の両者に発生異常をもたらすことを明らかにした。
- (2) 次にこの経路上の代謝産物の解析から、代謝中間体より派生するガラニル・ガラニル産物の存在が血管の発生に必須であることを見だし、これによってプレニル化を受ける機能タンパクがその作用を担うことを予測した。ガラニル・ガラニル基をタンパクに付与する酵素にはI型、II型の2種類が知られ、それぞれ標的となるアミノ酸配列が異なっている。この

うち特にII型の付加酵素が必須であり、これによって活性化をうけるrabファミリー遺伝子群が血管の発生に重要な役割を持つことを発見した。

- (3) 続いてゼブラフィッシュのrabファミリー遺伝子をクローニングし、それぞれについてGTP結合部位に変異を持つドミナント・ネガティブ体を作製して血管内皮細胞に発現させたところ、エンドサイトーシスに関連する機能を持つグループで、変異体と同様の異常を再現することができた。



ドミナント・ネガティブ体を血管内皮細胞に発現させ(緑色)蛍光ビーズによるアンジオグラフィを行った。
左側に正常型、右側に異常型の例を示す。

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. Tanaka, H., Nojima, Y., Shoji, W., Sato, M., Nakayama, R., Ohshima, T., Okamoto, H., Islet1 selectively promotes peripheral axon outgrowth in Rohon-Beard primary sensory neurons, *Developmental Dynamics*, 240, p9-22, 2011 (査読あり)
2. Li, L., Shoji, W., Oshima, H., Obinata, M., Fukumoto, M., Kanno, N., Crucial role of peroxiredoxin III in placental antioxidant defense of mice, *FEBS Lett.*, 582, p2431-2434, 2008 (査読あり)
3. Shoji, W. and Sato-Maeda, M., Application of heat shock promoter in transgenic zebrafish, *Dev Growth Differ*, 50, p401-406, 2008 (査読あり)

4. Sato-Maeda, M., Obinata, M., and Shoji, W., Position Fine-Tuning of Caudal Primary Motor Neurons in Zebrafish Spinal Cord, , Development, 135, p323-332, 2008 (査読あり)

[学会発表] (計 16 件)

1. 前田 (佐藤) 美香、東海林互, 神経冠細胞と運動神経軸索との相互作用が、脊髄内・外のインターフェースの保全に果たすについて, 第 135 回東北大学加齢医学研究所・集団会、2011 年 1 月 28 日、仙台市
2. 前田 (佐藤) 美香、東海林互, ゼブラフィッシュ胚における一次運動神経細胞体を脊髄に保持する機構について, 第 81 回日本動物学会年会、2010 年 9 月 23 日、東京都
3. Sato-Maeda, M. and Shoji, W., neural crest-derived cells are involved with early mechanisms to maintain motoneuron cell bodies in zebrafish embryonic spinal cord, 第 43 回日本発生生物学会年会、2010 年 6 月 21 日、京都市
4. 梅田恵子、東海林互、石塚徹、八尾寛、Transgenic zebrafish expressing an optimized channelrhodopsin variant under regulation of Gal4/UAS systems: optogenetic stimulation of Rohon-Beard neurons, 第 87 回日本生理学会大会、2010 年 5 月 19 日、盛岡市
5. 前田 (佐藤) 美香、東海林互、Neural crest-derived cells maintain motor neuron cell bodies in zebrafish embryonic spinal cord, 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜市
6. 梅田恵子、東海林互、石塚徹、八尾寛, 神経細胞特異的に改変型チャンネルロドプシンを発現しているトランスジェニックゼブラフィッシュの運動機能評価, 第 42 回東北生理談話会、2009 年 10 月 17 日、盛岡市
7. 前田 (佐藤) 美香、東海林互, ゼブラフィッシュ運動神経細胞体の脊髄からの脱落現象について, 第 80 回日本動物学会年会、2009 年 9 月 17 日静岡市
8. 梅田恵子、東海林互、石塚徹、八尾寛, GAL4-UAS 制御下に改変型チャンネルロドプシンを発現するトランスジェニックゼブ

ラフィッシュの作製とその評価, 第 15 回小型魚類研究会、2009 年 9 月 12 日、名古屋市

9. 前田 (佐藤) 美香、東海林互, ゼブラフィッシュ胚・運動神経細胞体の脊髄からの脱落現象, 第 15 回小型魚類研究会、2009 年 9 月 12 日、名古屋市
10. 東海林互, コレステロール代謝経路と発生異常, 第 6 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム・第 14 回学際ライフサイエンスシンポジウム (シンポジウム講演) 2009 年 6 月 16 日、仙台市
11. 東海林互, 脂質代謝と発生異常, 2009 NIG Zebrafish meeting、2009 年 3 月 18 日、三島市
12. 東海林互, ゼブラフィッシュに見る脊髄運動神経細胞の規則的な配列とその形成機構、応用数学連携フォーラム 第 6 回ワークショップ、2008 年 10 月 22 日、仙台市
13. Sato-Maeda, M., and Shoji, W., Generation of iterative motor nerve pattern in zebrafish spinal cord, Frontiers in Developmental Biology, Joint meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology, 2008 年 9 月 13 日、Giens (フランス)
14. Sato-Maeda, M., and Shoji, W., Generation of iterative motor nerve pattern in zebrafish spinal cord, Axon guidance, Synaptogenesis & Neural plasticity in Cold Spring Harbor Laboratory, 2008 年 9 月 10 日、Cold Spring Harbor (米国)
15. 前田 (佐藤) 美香、東海林互、ゼブラフィッシュ一次運動神経における細胞体の位置調整、日本動物学会第 79 回大会、2008 年 9 月 6 日、福岡市
16. Sato-Maeda, M., Obinata, M., and Shoji, W. Positional adjustment of zebrafish primary motoneurons before axonogenesis, 第 41 回日本発生生物学会、2008 年 5 月 28 日、徳島市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/cellbio/Site04F/Site04/zindex>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東海林 互 (SHOJI WATARU)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：40250831

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし