

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570246

研究課題名(和文) 発生期におけるコレステロール代謝と細胞機能の制御

研究課題名(英文) Roles of cholesterol synthetic pathway during embryonic development

研究代表者

東海林 互 (Shoji, Wataru)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・准教授

研究者番号：40250831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：コレステロール合成系路に欠損をもつゼブラフィッシュ変異体では血管網の解剖学的パターンが正常であるにも関わらず、内腔の低形成が引き起こされる。この現象に着目して合成・代謝酵素群の系統的な解析を行い、コレステロール生合成の中間体より派生するゲラニル・ゲラニル産物の存在が内腔形成に必須であることを見いだした。この代謝産物はプレニル化により低分子量Gタンパクの活性化に寄与するが、血管内腔の形成に関しては低分子量Gタンパクの1グループであるrabファミリー遺伝子群が必須であることが明らかになった。さらに同様の分子メカニズムによる内腔形成機構が哺乳動物においても保存されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our previous study indicated Zebrafish mutant that has defect in cholesterol synthesis pathway exhibits blood vessel development. In this study, we report geranyl-geranyl products that derive from intermediate metabolite of this pathway, is essential for blood vessel development. Prenyl modification activates numbers of small G proteins, and we found rab family members are involved in the blood vessel formation. We are further investigating if same mechanism is conserved in mammalian blood vessels.

研究分野：Developmental biology

キーワード：zebrafish blood vessel cholesterol

## 1. 研究開始当初の背景

神経系と血管系のネットワークの形成過程には多くの点で共通の分子基盤のあることから、報告者は神経・血管の双方に異常を引き起こすゼブラフィッシュ変異体を同定することによりこの問題へのアプローチを試みてきた。この過程で得られた新規の変異系統では、1)血管の走行パターンが正常であるが内腔のみが欠損、2)末梢感覚神経がいったんは正しく形成された後に軸索が変性、3)色素細胞が正常に分化した後での形態変化とメラニン産生の欠乏、といった多彩な異常が発生し、さらにポジショナル・クローニングの結果、HMGCoA 合成酵素遺伝子が変異の原因遺伝子であることが判明した。この酵素はコレステロール合成の第1番目の反応を触媒しており、合成経路の下流にあるいずれかの代謝産物の欠乏が異常を引き起こしたと考えるとコレステロール代謝経路が介在する新規の発生システム研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

コレステロール合成経路は種々のステロイドホルモンの構造骨格を供給するとともに、低分子量 G タンパクなどの機能発現に必要なプレニル基、糖鎖修飾の脂質キャリアとなるドリコールなどを産生する重要な代謝経路である。この代謝系路に変異を持つ変異体での欠乏が予測される産物の中から、特に血管内腔の形成に必須な産物を特定すること、さらに代謝産物の標的と作用機序を解析し、コレステロール代謝が制御する生命現象を新たに理解することを目標とした。

## 3. 研究の方法

(1) 異常を引き起こす原因となる代謝産物の探索には、図1に示すようにコレステロール合成の主系路および側副路の分岐部にあたる酵素遺伝子、また反応系のボトルネックにあたる酵素遺伝子を選択し、アンチセンス・モルフォリノをゼブラフィッシュ受精卵に顕微注入することによる遺伝子機能阻害実験を体系的に行った。さらに反応酵素阻害剤の投与実験、候補代謝物質の卵黄への注入による表現型の救済実験を併用し原因となる代謝産物を判定した。

(2) 特定した代謝産物の標的、作用機序を解析するために、標的候補遺伝子のドミナント・ネガティブ体の作成、これを血管内皮細胞に特異的に発現させる fli-1 プロモーターに連結した DNA コンストラクトを作成した。さらにこれをゼブラフィッシュ胚で発現させ、血管内腔形成への関与を判定した。

(3) ゼブラフィッシュ胚を用いて見いださ

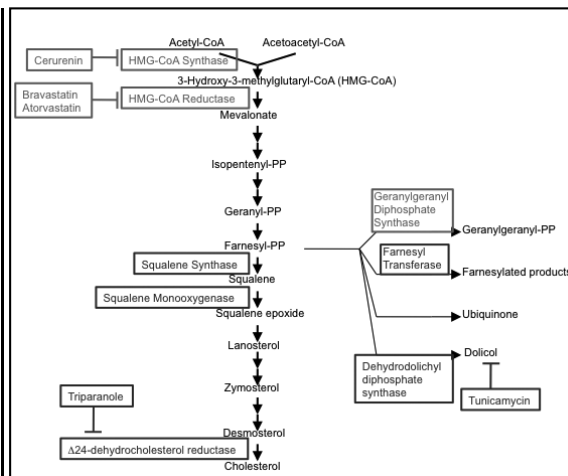


図1：コレステロール合成経路にみられる代謝産物

□ で囲んだ代謝酵素の機能阻害実験を体系的に行うことにより異常を引き起こす代謝産物を推測した。

れた血管内腔形成機構が哺乳動物において保存されているか否かを検討するために、Tie2-GFP トランスジェニック・マウスの皮下に新生血管を誘導し、さらにこれに対して siRNA によるノックダウン法で標的遺伝子の作用を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 変異体で血管内腔形成に異常を引き起こした原因がゲラニルゲラニルリン酸以降の代謝産物の欠乏であることを明らかにした。この代謝産物は低分子量Gタンパクをプレニル化し活性を賦与することが知られている。さらに内腔形成が rab ファミリーを標的とする「2型ゲラニルゲラニル転移酵素」および rab ファミリーの修飾に必須な因子「REP-1 (rab escort protein-1)」のノックダウンによって阻害されたことから、代謝産物の標的として細胞内輸送機構に関与する rab ファミリー遺伝子群が候補となることが示唆された。

(2) 約50個の rab ファミリーメンバー遺伝子に対してノックダウンおよびドミナントネガティブ体の発現解析を行った結果、ファミリーのなかでもエンドサイトーシスに関与するメンバーが血管内腔の形成に必須であること、さらにクラスリン非依存性のエンドサイトーシスが血管内腔の形成に関与することが強く示唆された。

(3) マウスの新生血管形成においてもゼブラフィッシュでみられたものと同様の代謝産物が必須であることを明らかにした。また、エンドサイトーシスに関与する rab ファミリーメンバー、クラスリン非依存性のエンドサイトーシスが哺乳動物においても同様に血

管内腔の形成に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

#### 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5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, *Dev. Dyn.*, 240, p9-22, 2011 (査読あり)

2. Imai H., Oomiya Y., Kikkawa S., Shoji W., Hibi M., Terashima T., Katsuyama Y., Dynamic changes in the gene expression of zebrafish Reelin receptors during embryogenesis and hatching period. *Dev Growth Differ.* 54, p253-263, 2012 (査読あり)

3. Umeda, K., Shoji, W., Sakai, S., Muto, A., Kawakami, K., Ishizuka, T. and Yawo, H., Targeted expression of a chimeric channelrhodopsin in zebrafish under regulation of Gal4-UAS system. *Neurosci. Res.*, 75, p69-75, 2013 (査読あり)

4. Kimura E., Deguchi T., Kamei Y., Shoji W., Yuba S., Hitomi J., Application of Infrared Laser to the Zebrafish Vascular System: Gene Induction, Tracing, and Ablation of Single Endothelial Cells., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 33, p1264-1270, 2013 (査読あり)

5. Kimura Y., Satou C., Fujioka S., Shoji W., Umeda K., Ishizuka T., Yawo H., Higashijima S., Hindbrain V2a neurons in the excitation of spinal locomotor circuits during zebrafish swimming, *Curr Biol.*, 23, p843-849, 2013 (査読あり)

[学会発表](計23件)

1. 前田(佐藤)美香、東海林互、運動神経軸索とシュワン細胞の初期相互作用, 第82回日本動物学会年会、旭川市神楽地区公共施設群(北海道・旭川市)、2011/9/21-23

2. Umeda, K., Shoji, W., Sakai, S., Ishizuka, T., Yawo, H., Optogenetic stimulation of transgenic zebrafish expressing an optimized channelrhodopsin variant, 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence(Italy), 2011/7/14 -17

3. Sato-Maeda, M., and Shoji, W., Early Interaction of Schwann precursors with motor axon, 第17回小型魚類研究会、東レ総合研修センター(静岡県・三島市) 2011/9/8-9

4. 梅田桂子、東海林互、酒井誠一郎、石塚徹、八尾寛、Transgenic zebrafish expressing optimized channelrhodopsin in Rohon-Beard neurons: escape behavior by light, 第34回日本神経科学大会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、2011/9/14-17

5. 東海林互、コレステロール代謝と発生異常、加齢研シンポジウム「発生物学の適応放散」、東北大学加齢医学研究所(宮城県・仙台市)、2011/10/21

6. 東海林互、光駆動性イオンチャンネルによるゼブラフィッシュ神経回路機能の解析, 第137回東北大学加齢医学研究所・集団会、東北大学加齢医学研究所(宮城県・仙台市)、2012/1/20

7. Wataru Shoji, Optogenetic analysis of fin movement, 第18回小型魚類研究会、2012年、京都大学医学部芝蘭会館(京都府・京都市)、2012/9/22-23

8. 前田(佐藤)美香、東海林互、TAG-1を介したゼブラフィッシュ一次運動神経軸索と神経冠細胞の相互作用, 第83回日本動物学会年会、大阪大学豊中キャンパス(大阪府・豊中)、2012/9/13-15

9. 木村英二、出口友則、亀井保博、東海林互、弓場俊輔、人見次郎、IR-LEGO顕微鏡を用いた血管内皮細胞における1細胞レベルでの遺伝子発現系の樹立, 第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)、2012/12/11-14

10. Kimura. E., Deguchi, T., Kamei, Y., Shoji, W., Yuba, S., Hitomi, J., Spatio-temporally regulated gene induction in the targeted single endothelial cells using an infrared laser, 第20回日本血管生物医学学会学術集会 / 第10回 Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 徳島県郷土文化会館(徳島県・徳島市)、2012/12/5-7

11. Sato-Maeda, M. and Shoji, W., Tag-1-mediated early interaction between neural crest cells and motor axons in zebrafish, 第47回日本発生物学会大会、くにびきメッセ(島根県・松江市)、2013/5/28-31

12. Kimura, E., Deguchi, T., Kamei, Y., Shoji, W., Yuba, S., Hitomi, J., Gene induction, tracing, and ablation of the targeted single endothelial cells using IR-LEGO system、第 19 回小型魚類研究会、仙台市情報・産業プラザ(宮城県・仙台市)、2013/9/20-21

13. Ihara, T., Yanglei, G., Matsui, S., Fei, X., Shoji, W., Hashimoto, K., Motion prediction, tracking and stabilization of free-swimming zebrafish、第 19 回小型魚類研究会、仙台市情報・産業プラザ(宮城県・仙台市)、2013/9/20-21

14. Matsui, S., Shoji, W., Hashimoto, K., Microscope systems for tracking zebrafish and light stimulation、第 19 回小型魚類研究会、仙台市情報・産業プラザ(宮城県・仙台市)、2013/9/20-21

15. 前田(佐藤)美香、東海林互、神経冠細胞はゼブラフィッシュ胚の運動神経・細胞体の位置の保持に關与する、第 84 回日本動物学会年会、岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)2013/9/26-28

16. Umeda, K. and Shoji, W. Optogenetic analysis of escape behavior in zebrafish larva、第 7 回神経発生討論会、大阪大学・銀杏会館(大阪府・吹田市)、2014/3/13-14

17. 梅田桂子、東海林互、ゼブラフィッシュ幼生逃避行動における光遺伝学的機能解析、第 49 回日本発生生物学会大会、ウイックあいち(愛知県・名古屋市)、2014/5/27-30

18. Tasaki, S., Nakayama, M., Shoji, W., Prediction of motile bacterial colonies, Mini-workshop on Modeling, Simulation & Analysis of Pattern Formation, 東北大学川井ホール(宮城県・仙台市)、2014/7/26-27

19. Tasaki, S., Nakayama, M., Shoji, W., Prediction of motile bacterial colonies, German-Japanese HeKKSaGOn Consortium Summer School, Inference on Pattern Formation: Applications to Biology and Materials Science, Göttingen (Germany) 2014/9/12-20

20. Umeda, K., Shoji, W., Optogenetic analysis of escape behavior in zebrafish larvae、第 20 回小型魚類研究会、慶應義塾大学薬学部(東京都・港区)、2014/9/20/21

21. 若村優、森本展行、中山勝文、東海林互、鈴木誠、PEG-スルホベタインコポリマーナノ粒子と細胞との相互作用、第 63 回高分子討論会、長崎大学(長崎県・長崎市)

2014/9/24-26

22. Tasaki, S., Nakayama, M., Shoji, W., Growth prediction of colonies of motile bacteria, -Interdisciplinary Mathematics toward Smart Innovations- Mathematical Approaches to Pattern Formation, 東北大学川井ホール(宮城県・仙台市)、2014/10/28-31

23. 森本展行、若村優、中山勝文、東海林互、鈴木誠、スルホベタイン-PEG コポリマーナノ粒子の細胞内取込挙動、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)、2014/11/17-18

〔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〕

<http://www.fris.tohoku.ac.jp/fris/organization/advanced/shoji.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東海林 互 (SHOJI WATARU)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・准教授

研究者番号：40250831

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし