

機関番号：63801

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500298

研究課題名（和文） Proteolipid ファミリー蛋白質の生理機能の解析

研究課題名（英文） Physiological functions of proteolipid family proteins

研究代表者

平田 たつみ（HIRATA TATSUMI）

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・准教授

研究者番号：80260587

研究成果の概要（和文）：Proteolipid ファミリーは、神経系で強く発現する4回膜貫通タンパク質である。このファミリー蛋白質の生理機能を知るために、これに属するM6aとM6b遺伝子破壊マウスの表現系を解析した。各々の単独遺伝子破壊では目立った表現系は見つからなかったが、M6aとM6bの二重変異体において脳梁が顕著に細くなる事がわかった。遺伝子破壊マウスの神経細胞の初代培養解析の結果、この異常の原因は、神経細胞自身の細胞自律的な突起伸長能力の低下によるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：The proteolipid family is a group of four transmembrane proteins that are highly expressed in the nervous systems. To gain a better understanding of physiological functions of these proteins, we analyzed brain phenotypes of gene knockout mice for M6a and M6b that belong to this family. Although no significant abnormalities have been so far detected in each single mutant, we found hypoplasia of the corpus callosum in the double mutant mice that had homozygous mutations in both of the genes. Primary culture analyses suggested that the neurons of these mutant mice have impaired ability to extend neurites.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経発生学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経 発生 軸索伸長 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 発生時に神経細胞は軸索を盛んに伸長させる。その時、重要なのが、軸索の先端にある成長円錐である。これが、盛んに運動しながら、軸索を引っ張りつつ移動する事で、

軸索伸長を引き起こすと考えられている。

(2) Proteolipid ファミリー蛋白質 M6a は、成長円錐に豊富に存在する事で同定された4回膜貫通タンパク質である。申請者らは、

これまでに、① M6a に抗体が結合すると軸索伸長が強力に阻害されること、②この軸索伸長阻害は成長円錐の崩壊を伴わないこと、および、③抗体は M6a の機能を阻害するのではなく、M6a への結合を介して gain-of-function 的に軸索伸長停止反応を誘起することを明らかにしてきた。

(3)M6a 蛋白質の機能については、申請者以外のグループからも、さまざまな機能が提唱されている。しかし、これまで、実際の個体における生理機能は検討されておらず、未だ不明である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、M6a を含む proteolipid ファミリー蛋白質の生理機能を明らかにする事を目的とした。これまでの研究で、M6a 遺伝子破壊マウスを作成したが、際だった表現系は見つかっていない。M6a には、M6b と DM20/PLP という2種類の類似分子が存在し、機能的補償効果が予想される。そこで、これらの遺伝子破壊マウスを入手して、M6a 遺伝子破壊マウスと交配し、多重遺伝子破壊マウスを作成して、表現系を検討した。

3. 研究の方法

(1) M6a 遺伝子破壊マウスは、我々がこれまで作成した系統を用いた。M6b および PLP 遺伝子破壊マウスは、Max Planck 研究所の H. B. Werner 博士と K-A Nave 博士から供与を受けた。

(2) M6a, M6b および PLP 突然変異マウスを交配して、二重および三重変異体を作成し、様々なマーカを用いて、脳の形態的な異常を探索した。

(3) 突然変異マウス胚の脳に、in utero electroporation 法を用いて蛍光蛋白質を導入し、軸索走行の異常を検討した。

(4) 突然変異マウスの脳から神経細胞を採取して初代培養し、軸索や樹状突起の形態を解析した。

4. 研究成果

(1) M6a と M6b の二重変異体を作製して、脳構造を解析したところ、脳梁が際立って細くなっていることがわかった(図1)。M6a や M6b 単独の突然変異体においては、正常体との間で、脳梁の太さに有意な差は認められなかったことから、予想どおり Proteolipid ファミリー間での補償効果がある事が示された。

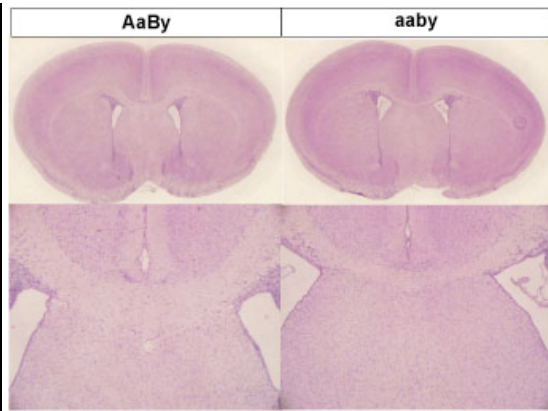


図1 M6a^{+/-}M6b^{+/y} (AaBy) と M6a^{-/-}M6b^{-/y} (aaby) の遺伝子型をもつ生後7日目マウス脳切片のニッセル染色像

(2) 脳梁の繊維を形成する新皮質神経細胞の数や密度について、様々な領野で計測した。その結果、脳のどの領野においても、二重変異体と野性型との間で違いは認められなかった(図2)。従って、軸索形成の過程に何らかの違いがあると予想された。

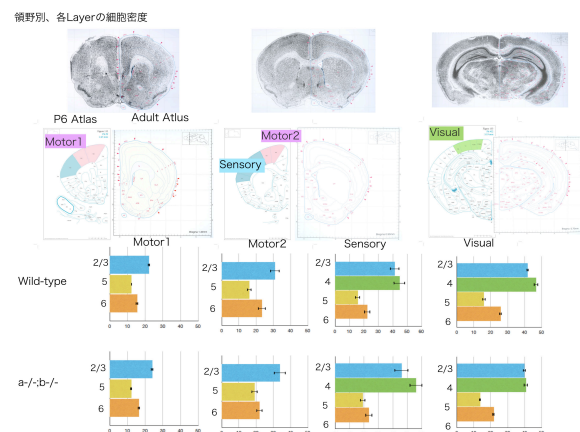


図2 M6a^{+/+}M6b^{+/y} (Wild-type) と M6a^{-/-}M6b^{-/y} (a-/b-/-) の遺伝子型をもつマウス脳における神経細胞密度の解析

(3) 脳梁の軸索伸長経路に乱れがあるかどうか検討する為に、in utero electroporation 法を用いて、新皮質神経細胞を標識して、軸索伸長経路を検討した。大きな乱れは認められなかったが、一部走行異常の可能性が示唆された。

(4) M6a と M6b 遺伝子の変異体、ならびに、野性型マウスの新皮質神経細胞を培養して、軸索および樹状突起の伸長の程度を解析した。その結果、変異体神経細胞において、軸索、樹状突起共に、伸びが悪いことがわかった。伸長が低下する原因は今のところ不明であるが、この細胞自律的な軸索伸長の障害が、

脳梁形成不全の原因の一つであると予想される。

(5) すべての Proteolipid ファミリー蛋白質遺伝子を破壊した M6a, M6b, PLP 三重変異体の作成をめざした。M6b と PLP が X 染色体上にあることもあり困難を極めたが、これまでになんとか数個体の三重変異マウス胚を回収する事ができた。詳細な解析は今後の課題である。

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 6 件)

1. Sato Y., Mita, S., Fukushima, N., Fujisawa, H., Saga, Y. and Hirata, T. Induction of axon growth arrest without growth cone collapse through the N-terminal region of four-transmembrane glycoprotein M6a. **Dev. Neurobiol.** (in press) 査読有り

2. Yamatani, H., Kawasaki, T., Mita, S., Inagaki, N. and Hirata, T. Proteomics Analysis of the Temporal Changes in Axonal Proteins during Maturation. **Dev. Neurobiol.** 70, 523-537 (2010) 査読有り

3. Nakadate, N., Uchida, K., Shikata, K., Yoshimura, S., Azuma, M., Hirata, T., Konishi, H., Kiyama, H. and Tachibana, T. The formation of argpyrimidine, a methylglyoxal-arginine adduct, in the nucleus of neural cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 378, 209-212 (2009) 査読有り

4. Ito, K., Kawasaki, T., Takashima, S., Matsuda, I., Aiba, A. and Hirata, T. Semaphorin 3F confines ventral tangential migration of lateral olfactory tract neurons onto the telencephalon surface. **J. Neurosci.** 28, 4414-4422 (2008) 査読

有り

5. Takagi, K., Okuda-Ashitaka, E., Mabuchi, T., Katano, T., Ohnishi, T., Matsumura, S., Abe, T., Hirata, T., Minami, T. and Ito, S. Involvement of stem cell factor and its receptor tyrosine kinase c-kit in pain regulation. **Neuroscience** 153, 1278-1288 (2008) 査読有り

6. Oginuma M., Hirata, T., Saga Y. Identification of presomitic mesoderm (PSM)-specific Mesp1 enhancer and generation of a PSM-specific Mesp1/Mesp2-null mouse using BAC-based rescue technology. **Mech. Dev.** 125, 432-440 (2008) 査読有り

[学会発表] (計 24 件)

1. Mita, S., Saga, Y., Werner, H.B., Nave, K-A, and Hirata, T., M6 proteins regulate axon outgrowth in mouse callosal neurons. 第33回日本神経科学会年会, 2010年9月2-4日, 神戸.

2. Hirata, T., Axon outgrowth inhibition mediated by four-transmembrane protein M6a. San Francisco – Japan Joint Meeting on Vertebrate Organogenesis, 2008 年 11 月 24 日, San Francisco, USA.

3. Hirata, T., Axon outgrowth inhibition mediated by four-transmembrane protein M6a. UTMD Anderson Cancer Center / RIKEN-CDB Joint Symposium: Vertebrate Development and Organogenesis, 2008 年 11 月 21 日, Houston, USA.

4. Hirata, T., Axon outgrowth inhibition mediated by a growth cone membrane protein. IISER - SOKENDAI Lecture Workshop on “Trends in

Modern Biology”, 2008 年 10 月 25 日, Pune,
India.

5. Hirata, T., Axon outgrowth inhibition mediated
by a growth cone membrane protein. Scientific
Colloquium at Department of Zoology,
University of Delhi, 2008 年 10 月 22 日, Delhi,
India.

[その他]

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/section/hirata/hirata-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 たつみ (HIRATA TATSUMI)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・准教授
研究者番号：80260587