

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770045
 研究課題名（和文） 外部刺激に応答した魚類の感覚器の形成／維持機構の解明
 研究課題名（英文） Sensory organ developments and responses corresponding to exogenous stimuli in fish.
 研究代表者
 飯田 敦夫 (ATSUO IIDA)
 京都大学・医学研究科・研究員(COE)
 研究者番号：90437278

研究成果の概要（和文）：統合失調症の原因遺伝子として知られているニューレグリンが、実際に生物の体の中でどのように働いているのかを明らかにする目的で研究を行った。小型魚類ゼブラフィッシュを用い、魚類の感覚器である側線器官が形成される過程、もしくは音などの刺激を受容する際にニューレグリンがどのように働き、感覚器や神経回路にどのように反映されるかの観察を行った。詳細なメカニズムに迫ることはできなかったが、感覚器形成に関わると思われるマーカー遺伝子の同定に成功した。

研究成果の概要（英文）：My purpose is a clarification of functions of the neuregulin, known as responsible gene of the schizophrenia, using live animal. To analyze roles of neuregulin in sensory organ developments and responses corresponding to exogenous stimuli, I chose lateral line, which is a sensory organ in fish, as a model tissue, and zebrafish as a model animal. In the result, I identify several novel genes as markers of lateral line, but could not trace a detailed behavior of lateral line developments and its responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年			
度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：器官形成、側線

1. 研究開始当初の背景

ニューレグリンは筋-神経接合部の形成に関わる膜型のグリア増殖因子である。細胞外ドメインがプロテアーゼにより切断を受けることで可溶型に変換され、レセプターである ErbB ファミリーの分子と結合してシグナルを伝達する。哺乳類ではニューレグリン-ErbB シグナルの阻害が、脳の白質に病的変性を生じさせ、統合失調症の原因となることが示されている (Stefansson et al., 2002 ほか)。哺乳類培養細胞系においては、メルトリン β (Adam19; a disintegrin and metalloprotease 19) がニューレグリンの切断活性を持つとの報告がある (Sirakabe et al., 2001, Yokozeki et al., 2007)。しかし現在まで、個体でニューレグリンの切断がどのように制御されているかはよく分かっていない。

マウスを用いた病理学的解析で、個体におけるニューレグリンの機能も徐々に明らかになってはいる。しかし、数多くのアイソタイプをもつニューレグリンの機能を網羅的に解析するための逆遺伝学的手法には、時間と手間がかかる。そこで私は、小型魚類ゼブラフィッシュを用いたニューレグリンの機能解析を提案した。ゼブラフィッシュは飼育が容易く、体も小さいため省スペースで維持・繁殖が可能である。何より透明な胚が体外受精で発生し、基本的な形態形成が 48 時間以内に終了するといったメリットから、発生学の分野において 1990 年代初頭から急速に普及したモデル動物である。近年では胚操作の手法も確立され、遺伝子導入や生化学的解析などで他のモデル動物と遜色なく扱える。またゼブラフィッシュ独自の利点として、特定の組織を蛍光タンパク質で標識したトランスジェニックゼブラフィッシュを用い、発生過程を生きたまま観察できるということが挙げられる。

また、ニューレグリンの神経回路形成における機能を調べるためのモデルとして、魚類の感覚器である側線器官の形成・分化に注目した。側線器官は水流や音を需要する器官で、体表で発生・維持されるために観察に適している。

2. 研究の目的

魚類の側線形成をモデルとして、感覚器形成におけるニューレグリンの機能・動態に迫る

ニューレグリンのような膜型の増殖因子は、タンパク質として膜状に存在する

だけでは機能せず、翻訳後に切断を受けることによって初めて機能を持つ。したがって、WISH や RT-PCR による遺伝子レベルの解析では不十分であり、切断をおこなう因子の決定や、切断を受けた活性化型の分子を追跡することにより、はじめて本来の機能に迫ることができる。よって本研究では、個体においてニューレグリンの切断を担うプロテアーゼの同定を行う。マウス培養細胞系ではメルトリン β (Adam-19) がニューレグリンを切断する (Yokozeki et al. 2007)。よって、本研究においても ADAM プロテアーゼを中心に候補因子の絞り込みを行う。

感覚器形成を「刺激に対する応答」という面からも明らかにする

研究代表者の所属講座では、マウスにおいて、重力が外部刺激となってニューレグリンの活性化 (切断による可溶化) を引き起こし、感覚器のネットワーク形成に関与しているとの仮説を提議・検証している。しかしそれを、哺乳類を用いた実験系で証明することは困難であり、思うようには解析は進んでいない。そこで研究代表者は、より扱いが簡便なゼブラフィッシュと、その感覚器である側線に着目して実験を行う。具体的には、人為的に水流や振動をゼブラフィッシュ稚魚に連続して与え、側線の形成や維持に何らかの変化が見られるかを、側線が光る遺伝子組み換えゼブラフィッシュを用いて生きた状態で観察する。また、同条件下でニューレグリン分子の動態 (発現量、可溶化) などを WISH や免疫染色で追跡し、変化を探る。

このように、初期発生時における感覚器形成について、従来の「遺伝子・タンパク質レベルでの制御→表現型」という遺伝学的な解釈・追跡のみではなく、「外部刺激→必要とされる機能→遺伝子・タンパク質レベルでの制御→表現型」という、刺激に対する応答という観点での解析が、本研究課題の特徴である。

脊椎動物の感覚器形成において「刺激受容→応答としての形態形成」は普遍的な現象であるか？

受精後 24 時間以降の、より発生の進んだ胚においては、ニューレグリンの発現は側線原基以外にも前腎管で観察される。前腎管は浸透圧調節を行う感覚器であり、側線と同様に繊毛細胞を受容器として持っている。よって私は、ニューレグリンは繊毛細胞に関連する機能を担っており、感覚器形成に関与するのでは

ないかと考えている。感覚器における繊毛細胞は、脊椎動物に共通して見られる細胞構造である。本研究課題は側線におけるニューレグリンの機能に特化したものだが、発展として他の感覚器の調査を行えば、共通する機構が発見できる可能性は十分高いと見込んでいる。これは、本研究課題とその発展研究の成果が、そのまま他の脊椎動物の感覚器の研究にも応用できることを意味している。

3. 研究の方法

(1) 魚類側線器官の発生・成熟を生きた個体で追跡するための、トランスジェニックゼブラフィッシュを構築する。

(2) 遺伝子発現解析および機能阻害解析から、側線器官の発生・成熟に関わる候補遺伝子をピックアップする。

(3) 構築したトランスジェニックフィッシュを用い、候補遺伝子が側線器官の発生にどのように影響するかを精査する。

(4) 水流や音などの刺激を与えた際の、候補遺伝子の発現・機能の変化や、側線器官の形態について調査を行う。

(5) 発生過程、および刺激を与えた場合に、ニューレグリン等のシグナル伝達分子の挙動の変化を解析する。

4. 研究成果

遺伝子発現および阻害剤を用いた解析により、側線の形成にはニューレグリンおよびレセプター分子が関与したシグナル伝達が必要であることが判明した。そこで、側線が生きた状態で可視化できるトランスジェニックフィッシュおよびニューレグリン抗体を入手し、側線形成のライブイメージングおよび、ニューレグリン分子の挙動を検出系する系を構築した。構築した系の元で、ゼブラフィッシュ稚魚に水流や音などの物理的な刺激を加え、側線形成やニューレグリン分子の動態の調査を行った。しかし、いずれの場合も側線形成や分子の動態に顕著な違いは見られなかった。今後、より解像度の高い検出系の構築や、より進んだ発生段階の魚を用いて側線の「発生」ではなく「発達」に注目した解析が必要だと結論づけた。

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 1 件)

① Iida, A., et al. Metalloprotease-

Dependent Onset of Blood Circulation In Zebrafish. *Current Biology*, 査読有り in press.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 飯田敦夫、坂口和弥、工藤寛明、坂口泰子、川原敦雄、瀬原淳子: ゼブラフィッシュの形態形成における adam-8 プロテアーゼ因子の役割、BMB2008、2008.12.9 (兵庫県)
- ② 瀬原淳子、佐藤文規、飯田敦夫、佐藤智美: ゼブラフィッシュの筋維持における ErbB リガンド・ニューレグリンの役割、第 25 回宇宙利用シンポジウム、2009.1.15 (神奈川県)
- ③ Atsuo Iida, et al.: Roles of ADAM protease Meltrin 8 (ADAM19) in the circulatory organ development. International Society for Stem Cell Research 7th Annual Meeting、2009.7.9. (スペイン)
- ④ 岩木彩、飯田敦夫、瀬原淳子: 膜型プロテアーゼ ADAM により制御される血液循環の開始はプロテアーゼ阻害剤の血管内投与により抑制できる、第 15 回小型魚類研究会、2009.9.12 (愛知県)
- ⑤ 飯田敦夫、坂口和弥、佐藤洋旭、岩木彩、瀬原淳子: 胚発生における最初の血液循環は、血管内腔への赤血球の移動とプロテアーゼによる細胞接着の解除により開始する、第 15 回小型魚類研究会、2009.9.12 (愛知県)
- ⑥ 飯田敦夫、坂口和弥、佐藤洋旭、岩木彩、瀬原淳子: Intravascular Proteolysis Triggers Synchronous Start of Blood Circulation in Zebrafish、第 32 回日本分子生物学会年会、2009.12.11 (神奈川県)
- ⑦ 飯田敦夫、坂口和弥、佐藤洋旭、岩木彩、瀬原淳子: 胚発生における最初の血液循環は、血管内腔への赤血球の移動とプロテアーゼによる細胞接着の解除により開始する、第 32 回日本分子生物学会年会、2009.12.11 (神奈川県)
- ⑧ 佐藤洋旭、飯田敦夫、瀬原淳子: ADAM8 is an Active Metalloprotease That Can Shed the Ectodomain of PSGL-1 第 32 回日本分子生物学会年会、2009.12.11 (神奈川県)
- ⑨ Atsuo Iida, et al.: A Novel Role of ADAM Protease in Development. North American Vascular Biology Organization, Developmental Vascular Biology Workshop, 2010.2.10 (アメリカ)
- ⑩ Atsuo Iida: Intravascular Proteolysis

Triggers Synchronous Start of Blood
Circulation in Zebrafish. CDB シンポ
ジウム 2010 「Frontiers in
Organogenesis」、2010.3.23 (兵庫県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯田 敦夫 (ATSUO IIDA)

京都大学・医学研究科・研究員
(COE)

研究者番号：9043727