

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770131

研究課題名（和文）ゼブラフィッシュをモデル生物とした生理活性リゾリン脂質の機能解析

研究課題名（英文）analysis of lysophospholipid signaling in zebrafish

研究代表者 濱 弘太郎 <A5?CHFC
東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：20534481

研究成果の概要（和文）：

本研究課題は魚類の代表的モデル生物の一つであるゼブラフィッシュを用いて、リゾリン脂質シグナリングの作用機序、およびその関連分子を明らかにすることを目的とした。代表者は解析に不可欠であるトランスジェニック系統作製に必要な新規ベクターの作製およびそれを用いたトランスジェニック系統の作成を行った。特に、gal4-UAS システム、およびトランスポゾンを用いたシステムを用いたことで、様々な臓器に特異的に、目的の遺伝子を発現させるトランスジェニック系統を得ることに成功した。これらのトランスジェニック系統、およびモルフォリノなどを用いて、リゾリン脂質シグナルに関与することが予想される遺伝子の解析を行うことで、各遺伝子が、目的の臓器において、いつ、どこで機能するかについて、解析を進めている。特に、リゾホスファチジン酸の代謝関連酵素、並びに受容体に着目して解析を進め、すでに、いくつかの臓器の形成過程に必須な遺伝子群の同定に成功した。これらについては、論文投稿の準備を進めている。リゾリン脂質シグナルに関する受容体並びに代謝酵素は、脊椎動物以上の高等動物に保存されていることが多く、ゼブラフィッシュは、リゾリン脂質シグナル関連遺伝子を有する最も下等なモデル動物の一つである。本研究結果は、これまで、哺乳類のモデル動物を中心に解析されてきたリゾリン脂質シグナルの解析に、ゼブラフィッシュという新たなモデル動物が有効であることを示す意義を有する。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is clarifying the molecular machinery of lysophospholipid signaling using zebrafish. We first modified several vectors using gal4-UAS system and transposon (tol2) to facilitate making transgenic lines. Using this vectors, we succeeded in establishing several transgenic lines. These are useful tools to elucidate the timing and the place in which lysophospholipid signaling functions. We succeeded in discovering several genes involved in some organogenesis. Zebrafish is considered as the lowest model organisms which possesses lysophospholipid signaling related genes. Our study shows that zebrafish as a useful model organisms to elucidate the lysophospholipid signaling in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010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：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：リゾホスファチジン酸、受容体、産生酵素、ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

代表的なリゾリン脂質の1つであるリゾホスファチジン酸 (LPA) は非常に単純な構造を有するリゾリン脂質であるが、様々な細胞応答・生理作用を有する生理活性脂質である。LPA は細胞膜上の特異的 G タンパク質共役型受容体(LPA1-6)を介して作用を発揮することが知られている。一方、LPA の産生機構としてオートタキシン (ATX) が存在するが、そのノックアウトマウスの表現型 (血管形成異常) は、いずれの LPA 受容体単独のノックアウトマウスにも観察されず、血管形成における LPA の作用機序は不明な点が多かった。

2. 研究の目的

血管形成過程における LPA シグナルの作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

データベースサーチによりゼブラフィッシュ LPA 受容体ホモログを見出し、クローニング、および培養細胞に発現させその LPA に対する応答性を評価する。また、血管特異的プロモーター支配下に EGFP を発現させることにより血管を非侵襲的に可視化できるゼブラフィッシュを用意し、その個体内で ATX の機能を抑制した時の血管形成への影響を観察する。さらに、血管特異的に ga14 遺伝子を発現させるトランスジェニックフィッシュを作成し、血管特異的に様々な遺伝子を発現できるようにする。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ LPA 受容体ホモログのクローニング、およびその LPA 刺激に対する応答性の確認

マウスおよびヒト LPA 受容体を元にゼブラフィッシュのゲノムデータベースをサーチしたところ、各 LPA 受容体に対するホモログ候補遺伝子を見出した。この遺伝子をクローニン

グし、培養細胞に発現させ、LPA 刺激下における細胞応答を計測したところ、殆どのホモログについて、LPA に対する応答性が確認された。一部の受容体ホモログの LPA 応答性は、LPA 受容体アンタゴニストの Ki16425 によって阻害された。以上の結果は、ゼブラフィッシュ内でも LPA シグナルが機能することを示唆する。

(2) ゼブラフィッシュ LPA 受容体の血管形成過程における役割

ゼブラフィッシュの血管形成過程における各 LPA 受容体の機能を解析するために、LPA 受容体の機能を抑制するために必要なアンチセンスモルフォリノ (MO) を作製した。作製した MO により、正常なスプライシングを阻害することにより異常な mRNA が合成される (スプライシング阻害型 MO)、あるいは翻訳が阻害されることを確認した (翻訳阻害型 MO)。LPA 受容体の機能抑制時に観察される血管の発生過程への影響を解析するために、血管特異的プロモーター支配下に EGFP を発現させることにより血管を非侵襲的に可視化できるゼブラフィッシュを用意し、その胚へ MO の投与を行った。その結果複数の LPA 受容体に対する MO を投与した胚では、血管形成過程が顕著に乱れていた。このことは、ゼブラフィッシュでは、LPA は複数の LPA 受容体を介しても血管形成を制御することが示された。

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 3 件)

1. Nishimasu H., Okudaira S., Hama K., Mihara E., Dohmae., Inoue A., Ishitani R., Takagi L., Aoki J. Nureki O Crystal

structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. Nat Struct Mol Biol. 2011 18 (2) 205-212 査読有

2. Nakanaga K., Hama K., Aoki J. Autotaxin-an LPA producing enzyme with diverse functions. J Biochem 148:13-24 2010 査読有

3. Nakanaga K., Hama K., Aoki J. LPA3, a unique G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid Prog. Lipid Res. 2010 49, 335-342 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. 濱弘太郎、青木淳賢、モデル生物を用いた LPA シグナルの作用機序の解析、日本薬学会第 131 年会、2011. 3. 28 静岡、静岡県コンベンションアーツセンター
2. 可野邦行、濱弘太郎、青木淳賢、リゾホスファチジン酸受容体 LPA₃ を介した求心性迷走神経活性化作用の解析、日本薬学会第 131 年会、2011. 3. 28 静岡、静岡県コンベンションアーツセンター
3. 有馬直明、濱弘太郎、青木淳賢、ゼブラフィッシュを用いた LPA シグナリングの骨形成における機能解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 12/8、兵庫、神戸ポートアイランド
4. 板井恵理子、濱弘太郎、青木淳賢、胎生期骨形成における LPA シグナリングの役割の解明、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 12/8、兵庫、神戸ポートアイランド
5. 可野邦行、濱弘太郎、青木淳賢、LPA₃ を介した降圧・徐脈作用機構の解明、第 33

回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 12/8、兵庫、神戸ポートアイランド

6. 中永景太、濱弘太郎、青木淳賢、ATX-LPA シグナルによる S1P シグナルの抑制、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 12/8、兵庫、神戸ポートアイランド
7. 雪浦弘志、濱弘太郎、青木淳賢、血管形成におけるオートタキシン-LPA シグナルの解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 12/8、兵庫、神戸ポートアイランド
8. 濱弘太郎、青木淳賢、モデル生物を用いた LPA シグナルの作用機序の解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 12/8、兵庫、神戸ポートアイランド
9. 山本泰生、濱弘太郎、青木淳賢、NPP6 の肝臓における発現解析、第 49 回日本薬学会東北支部大会、2010 10/24、福島、奥羽大学
10. 有馬直明、濱弘太郎、青木淳賢、ゼブラフィッシュを用いた LPA シグナリングの骨形成における機能解析、第 16 回小型魚類研究会、2010 9/18、埼玉、プラザイースト
11. 中永景太、濱弘太郎、青木淳賢、ゼブラフィッシュを用いた生理活性脂質の機能解析、第 16 回小型魚類研究会、2010 9/18、埼玉、プラザイースト
12. 雪浦弘志、濱弘太郎、青木淳賢、血管形成におけるオートタキシン-LPA シグナルの解析、第 16 回小型魚類研究会、2010 9/18、埼玉、プラザイースト
13. 濱弘太郎、The functional interaction between lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate signaling in

heart morphogenesis in zebrafish、9th international conference on zebrafish development and genetics、2010 6/16、Madison, WI, USA

14. 中永景太、濱弘太郎、青木淳賢、ATX-LPA シグナルによる S1P シグナル抑制、第 52 回日本脂質生化学会、2010 6/15、群馬、秋森旅館
15. 雪浦弘志、濱弘太郎、青木淳賢、オートタキシントランスジェニックマウスの解析、第 52 回日本脂質生化学会、2010 6/15、群馬、秋森旅館

〔図書〕(計 1 件)

1. 中永景太、濱弘太郎、青木淳賢、血管におけるリゾリン脂質シグナリングの生理的および病理的役割、実験医学増刊 28 (17) 2831-39、羊土社

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 濱弘太郎
東北大学・大学院薬学研究科・助教
(HAMA KOTARO)

研究者番号：20534481

- (2) 研究分担者

()

研究者番号：

- (3) 連携研究者

()

研究者番号：