

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

2013年6月12日現在

機関番号：63801
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700477
 研究課題名(和文) 一次感覚ニューロンの生理遺伝学解析
 研究課題名(英文) Physiological genetics of primary sensory neurons
 研究代表者
 平田 普三(HIRATA HIROMI)
 国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授
 研究者番号：60402450

研究成果の概要(和文)：

我々は動物の触覚受容に必要な分子として E3 ユビキチンリガーゼタンパクであるリングフィンガープロテイン 121 を同定した。この分子を欠くゼブラフィッシュ変異体では電位依存性ナトリウムチャンネルが機能しないことから、リングフィンガープロテイン 121 が電位依存性ナトリウムチャンネルの機能に必須であることが分かった。リングフィンガープロテイン 121 を欠くゼブラフィッシュ変異体は触刺激にもマスタードオイルによる化学刺激にも応答しないことが確認され、この分子が侵害刺激受容、刺激物受容に必要であることが明らかとなり、感覚受容に普遍的に必要なであると予想される。

研究成果の概要(英文)：

We identified an E3 ubiquitin ligase ring finger protein 121 as an essential gene for mechanoreception. We also revealed that this gene is essential for voltage-gated sodium channel function. Zebrafish embryos that lack the ring finger protein 121 did not respond to either tactile stimulus or mustard oil, thereby demonstrating that the ring finger protein 121 is indispensable for mechanoreception and chemical reception, which are essential for survival of animals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋生理学

キーワード：体性感覚

1. 研究開始当初の背景

五感（視覚、聴覚、味覚、嗅覚、触覚）は紀元前にアリストテレスが定義したとされるが、これらの感覚について、個別の受容ニューロン（視細胞、嗅上皮細胞など）が存在し、それぞれの受容体分子（ロドプシン、嗅覚受容体など）が知られている。しかし、触覚に関しては受容に必要な分子の知見が乏しく、そのメカニズムも不明のままである。研究代表者はゼブラフィッシュを用いた遺伝学的アプローチでこの問題に取り組み、触覚受容に必要な因子の同定を試みた。

2. 研究の目的

触覚受容に異常のあるゼブラフィッシュの変異体を単離して、その責任遺伝子をマッピング、クローニングによって同定する。また、その分子の異常によりなぜ触覚受容に異常が現れるかを電気生理学等を用いて解明する。さらに侵害刺激以外の刺激、たとえばマスタードオイルなどの刺激物による化学刺激との関係を明らかにすることで、触覚受容の分子基盤を明らかにすると同時に、動物の感覚受容に普遍的な受容原理の解明を目指す。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュのスクリーニングを行い、触刺激応答に異常のある変異体を単離する。変異のキャリアを遠系統のゼブラフィッシュと交配することでマッピングファミリーを作製し、マイクロサテライトマーカを用いたマッピングを行う。責任領域にある候補遺伝子をクローニングしてシークエンスすることで変異を同定する。また、さまざまな染色や電気生理解析で感覚受容異常の原理

を明らかにする。さらに、触刺激だけでなく、マスタードオイルを用いた化学刺激なども併用し、一次感覚ニューロンによる感覚受容に普遍的なシステムを電気生理などの生理学的手法で解析する。

4. 研究成果

正常なゼブラフィッシュ個体に侵害刺激を与えると尾を左右に振る、あるいは泳いで逃げるといった逃避運動をする。研究代表者が単離した変異体は侵害刺激に全く応答せず、逃避運動をしないもので、発生に異常がないことは確認している。これらの変異体の責任遺伝子を同定すべく、遠系統のゼブラフィッシュと交配してF2世代を作製し、F3ホモ個体を得てマッピングを遂行した。214種類のマイクロサテライトマーカを用いたラフマッピングの後にゲノム情報を利用してマイクロサテライトマーカを自作して詳細なマッピングを進めた。第21番染色体上のユビキチンリガーゼタンパクであるリングフィンガープロテイン121に変異を同定した。この遺伝子はユビキチンリガーゼタンパクであることから、プロテアソーム依存的なタンパク分解に関わり、特定の基質にユビキチンを付加する反応を触媒するものと予想される。変異体にこの遺伝子のメッセンジャーRNAをインジェクションで導入すると変異をレスキューすることができた。またアンチセンスモルフォリノを用いたノックダウンを正常個体に行うと変異体の表現型を再現できたことから、変異体の責任遺伝子はリングフィンガープロテイン121に間違いないと確認できた。この変異体では感覚ニューロンに異常があるを思われるので、感覚ニューロンを刺激するマスタ

ードオイルに対する反応を調べると、正常個体ではマスタードオイルに反応して逃避が誘導されるが、変異体ではマスタードオイルに誘発される逃避は観察されなかった。さらにマスタードオイルによる感覚ニューロンの応答をカルシウムイメージングで解析すると、正常個体ではマスタードオイルによるカルシウム上昇が見られたが、変異体ではカルシウム上昇は見られなかった。これらのことから、リングフィンガープロテイン 121 は感覚ニューロンの応答に必要であると言える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Hirata, H., Nanda, I., van Riesen, A., McMichael, G., Hu, H., Hambrock, M., Papon, M.-A., Fischer, U., Marouillat, S., Ding, C., Alirol, S., Bienek, M., Preisler-Adams, S., Grimme, A., Seelow, D., Webster, R., Haan, E., MacLennan, A., Stenzel, W., Yap, T. Y., Gardner, A., Nguyen, L. S., Shaw, M., Lebrun, N., Haas, S. A., Kress, W., Haaf, T., Schellenberger, E., Chelly, J., Viot, G., Shaffer, L. G., Rosenfeld, J. A., Kramer, N., Falk, R., El-Khechen, D., Escobar, L. F., Hennekam, R., Wieacker, P., Hübner, C., Ropers, H.-H., Geetz, J., Schuelke, M., Laumonnier, F. and Kalscheuer, V. M. (2013) Mutations of ZC4H2 are associated with arthrogryposis multiplex congenita and intellectual disability and through impairment of central and peripheral synaptic plasticity. *Am. J. Hum. Genet.* 92: 681-695. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.03.021

査読有り

- (2) Yamanaka, I., Miki, M., Asakawa, K., Kawakami, K., Oda, Y. and Hirata, H. (2013) Glycinergic transmission and postsynaptic activation of CaMKII are required for glycine receptor clustering in vivo. *Genes Cells* 18: 211-224. doi: 10.1111/gtc.12032
査読有り

- (3) Hirata, H., Wen, H., Kawakami, Y., Naganawa, Y., Ogino, K., Yamada, K., Saint-Amant, L., Low, S. E., Cui, W. W., Zhou, W., Sprague, S. M., Asakawa, K., Muto, A., Kawakami, K. and Kuwada, J. Y. (2012) Connexin39.9 is necessary for coordinated activation of slow-twitch muscle and normal behavior in zebrafish. *J. Biol. Chem.* 287: 1080-1089. doi: 10.1074/jbc.M111.308205
査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- (1) Hirata, H. Formation and function of glycinergic synapse in zebrafish. International Institute for Advanced Studies Research Project "Novel developments on the study of life and biological systems based on genome engineering and imaging science" The First Symposium. International Institute for Advanced Studies (Kizugawa). February 23, 2013.
- (2) Hirata, H., Ogino, K., Yamada, K., and

Harvey, R. J. Defective escape behavior in DEAH-box RNA helicase Dhx37 mutant zebrafish improved by restoring glycine receptor expression.

The 5th Strategic Conference of Zebrafish Investigators. Asilomar Conference Center. California, USA. January 21, 2013.

- (3) Hirata, H. Slow-twitch and fast-twitch muscle defects in zebrafish.

Cold Spring Harbor Asia Conference. The 5th Annual Zebrafish Disease Models Meeting. Fishing for Answers: Zebrafish Models of Human Development and Disease. Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China. April 19, 2012.

〔図書〕（計 1 件）

- (1) 平田 普三

グリシン受容体の構造と機能、Clinical Neuroscience 2012 年 (Vol. 30) 12 月号、p1352-1354（日本語総説）

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

平田 普三 (HIRATA HIROMI)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター
准教授

研究者番号：60402450

- (2) 研究分担者

なし

- (3) 連携研究者

なし