

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790304

研究課題名(和文) 個体内での血管新生・再生における カテニンの機能解析

研究課題名(英文) Understanding the role of beta-catenin for angiogenesis

研究代表者

寺井 健太 (TERAI, KENTA)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：20616073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：カテニンは血管形成に必須の分子であり、その欠損型マウスでは、血管形成不全により胎生致死である。しかしながら、いつどこでカテニンが活性化しているかは不明である。この問題を明らかにするために、我々はカテニンが活性化した血管細胞において、緑色蛍光タンパク質(GFP)が発現する系を用いて、魚類の血管新生時に、いつどこで活性化しているのか明らかにした。上記の系を用いて、なぜ活性化するのか、なぜ活性化する事が血管形成に重要なのかを明らかにした。に対しては、BMP依存的にAGGF1が発現する事が関与していることが明らかとなった。に対しては、血管細胞の分化・生存に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis is an essential event for animal development. Beta-catenin is a well-known molecule for regulating angiogenesis. Lack of beta-catenin in blood vessel cells cause vascular abnormality and poor development in mouse. However when and where beta-catenin is activated is not well known. To understand and visualize beta-catenin activity, we generated transgenic zebrafish which represents beta-catenin transcriptional activity in living fish. By using the fish, we identified that beta-catenin activated cells during caudal vein plexuses formation. Furthermore, the activity of beta-catenin is positively regulated by Bone Morphogenetic Protein (BMP) dependent Angiogenic factor with G patch and FHA domains 1 (AGGF1) expression. The activation of beta-catenin in CVP is dispensable for cell survival and cell differentiation.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 血管新生 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

カテニンを血管内皮特異的に欠損、または活性化させたマウスは、胎生期において血管形成異常により致死となる。この結果は、血管内皮におけるカテニンの転写活性は厳密に制御されていることを示しているが、詳細な機序はいまだ不明である。

2. 研究の目的

血管研究のモデル生物として有用なゼブラフィッシュを用いて、血管新生時におけるカテニンの転写活性を血管内皮特異的に解析する。さらに、得られた知見を活用し、外部からのカテニン制御を介した血管再生誘導方法を確立する。

目的 1: 血管新生におけるカテニンの転写活性変化を明らかにする。

目的 2: カテニンの亢進・抑制が、血管新生に与える影響を明らかにする。

目的 3: カテニンの亢進・抑制が、遺伝子発現プロファイルに与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

目的 1 に対して、血管内皮においてカテニンが活性化される GFP が誘導される系を作製した。この系を用いて、どの細胞で、どの時期に GFP が誘導されるか継時的に検討し、転写活性変化を明らかにした。

目的 2 に対して、血管内皮特異的にカテニンの転写活性を抑制する優勢劣性変異体を発現させ、形態に与える影響を解析した。

目的 3 に対して、GFP 陽性細胞を回収し、RNA の発現レベルを解析した。

4. 研究成果

血管新生におけるカテニンは、時期・部位特異的に活性化している。

カテニンの転写活性変化を明らかにする

ために、カテニンの活性をモニターするゼブラフィッシュを作製し、観察した。その結果、(A) 房室弁 (B) 頭部血管 (C) 尾部静脈叢 (D) 総基本静脈の 4 部位に強い GFP の蛍光を検出した。これら 4 部位のうち、我々は尾部静脈叢に着目した。

尾部静脈叢の形成にカテニンの転写能は必須である。

尾部静脈叢における、カテニンの機能を明らかにするために、血管内皮特異的にカテニンの転写活性を抑制する優勢劣性変異体を発現させ、形態に与える影響を解析した。その結果、転写活性を抑制したゼブラフィッシュでは、尾部静脈層の異常が認められた。また、尾部静脈叢の細胞特異的に、細胞死が誘導されることが明らかとなった。このことから、カテニンの転写能は、尾部静脈層において、細胞の生存に必須であることが明らかとなった。

尾部静脈叢のカテニン転写活性は BMP により活性化される。

BMP による情報伝達経路は、尾部静脈叢形成に必須であることが知られている。従って、我々が明らかにした尾部静脈層におけるカテニンの機能に BMP が関与するか検討した。その結果、BMP を抑制したゼブラフィッシュでは、尾部静脈叢におけるカテニンの転写能が減少する事が明らかとなった。このことから、カテニンの転写能は、尾部静脈層において、BMP によって正に制御されていることが明らかとなった。

BMP による AGGF1 の発現誘導が、カテニン転写能を活性化する。

尾部静脈叢のカテニン転写活性は、どのような分子を介して BMP により活性化されるのか明らかにするために、カテニン転写活性が高い細胞を採取し、遺伝子発現プロフ

ファイルの変化を解析した。その結果、AGGF1 が カテニン転写活性と高い相関を示した。AGGF1 は カテニン転写能を正に制御する事が培養細胞で知られていたため、ゼブラフィッシュの尾部静脈層でも同様の経路が存在するか検討した。その結果、AGGF1 の発現抑制を行ったゼブラフィッシュでは、カテニン転写活性の減少が認められ、培養細胞と同様の経路が存在する事が示唆された。また、BMP と AGGF1 との関連性を明らかにするために、BMP の抑制が AGGF1 の発現に影響するか検討した。その結果、BMP により AGGF1 が発現誘導されることが明らかとなった。これ等の結果より、BMP による AGGF1 の発現誘導が、カテニン転写能を活性化する事が明らかとなった。

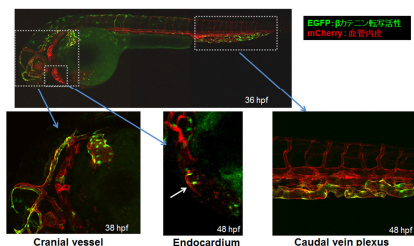


図 1 カテニンの転写活性を検出した結果、頭部・房室弁・尾部静脈叢において GFP 発現誘導が認められる。

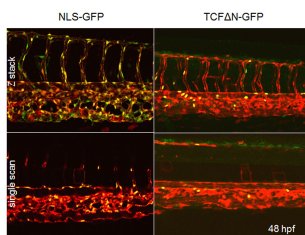


図 2 優勢劣性変異体を用いて カテニンの転写活性を抑制した結果、尾部静脈叢の異常が認められる。NLS-GFP: コントロール、TCF ΔN-GFP: 優勢劣性変異体が発現した Zebrafish

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)

Kashiwada T, Fukuhara S, Terai K, Tanaka T, Wakayama Y, Ando K, Nakajima H, Fukui H, Yuge S, Saito Y, Gemma A, Mochizuki N. -Catenin-dependent transcription is central to Bmp-mediated formation of venous vessels. *Development*. 2015 Feb 1;142(3):497-509. doi: 10.1242/dev.115576. 査読有り

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

寺井 健太 (Terai Kenta)

東京大学分子細胞生物学研究所 特任助
教

研究者番号：20616073

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

柏田 建 (Kashiwada Takeru)