

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：32601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290008

研究課題名(和文) 触覚受容の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of tactile response

研究代表者

平田 普三(Hirata, Hiromi)

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号：60402450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：動物は外界の状況をさまざまな感覚系で受容する。触覚はその1つであり、何らかのものが皮膚に接触すると、一次感覚ニューロンはその情報を中枢へ送る。本研究では触覚応答をしないゼブラフィッシュ変異体を足がかりに、触覚応答に関与する新規分子を同定し、その機能解析を行った。我々はRNF121というリングフィンガータンパク質が触覚応答に必要なことを見出し、これが小胞体に局在するユビキチンリガーゼであることを発見した。さらに、RNF121が電位依存性ナトリウムチャネルをユビキチン化し、分解系へ仕向けると同時に細胞内輸送を制御することから、電位依存性ナトリウムチャネルの品質管理に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified ring finger protein 121 (RNF121) as an endoplasmic reticulum-resident E3 ubiquitin ligase. The RNF121 regulates ubiquitination of voltage-gated sodium channel Nav1.6 and promotes its intracellular transport to a specific plasmamembrane region axon initial segment, where voltage-gated sodium channels form clusters. These results indicate that RNF121 is involved in the quality control of voltage-gated sodium channels and thus in mechanosensation and animal behavior.

研究分野：神経科学

キーワード：遺伝学 神経科学 遺伝子 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

古代ギリシアの哲学者アリストテレス (BC384-322) は人間の感覚として五感 (視覚、聴覚、味覚、嗅覚、触覚) を定義した。現在では他に温覚、冷覚、痛覚、内蔵感覚なども知られているが、これら全ての感覚系において、一次感覚ニューロンが存在し、受容体を発現し、中枢神経系への情報伝達を行う。触覚についても一次感覚ニューロンが存在するが、受容体やその他の分子実体について不明の点が多い。

2. 研究の目的

触覚応答に必要な分子を遺伝学的アプローチで同定し、その機能を培養細胞を用いた *in vitro* 解析とゼブラフィッシュを用いた *in vivo* 解析の両面から研究し、触覚の分子基盤を解明する。

3. 研究の方法

変異原 ENU を用いてゼブラフィッシュのゲノムに変異を導入し、F3 世代個体をピンセットでつついて触刺激応答を観察するが、正常な個体は体をくねらせる (1 日齢) あるいは泳いで逃げる (2 日齢) のに対し、触刺激に全く応答しない個体、複数回のタッチのトライアルに対して応答確率の低い個体を変異体の候補とし、さらに運動器 (筋や神経筋接合部) に異常がある個体を除外することで、触刺激応答を欠く変異体を得る。マッピングで変異体の責任遺伝子を同定し、*in situ* hybridization で責任遺伝子の発現部位・発現細胞を調べる。変異体では一次感覚ニューロンである Rohon-Beard ニューロンに異常があることが示唆されるので、このニューロンに特に注目して、形態染色で当該細胞の形態を解析し、電気生理で膜電気特性やシナプス伝達を解析し、さらに HEK293 細胞を用いた再構成系で責任遺伝子の機能を明らかにする。

4. 研究成果

正常なゼブラフィッシュは受精後 2 日以内に機能的神経回路が形成され、触刺激に対する逃避行動をするが、受精後 2 日の時点で触刺激に応答しない個体は変異体である。ゼブラフィッシュは受精後 2 日には Rohon-Beard ニューロンという一次感覚ニューロンで触覚を受容するので、Rohon-Beard ニューロンに注目して、変異体の解析を進めた。遺伝子発現を操作する GAL4-UAS システムを用いて GCaMP というカルシウム感受性蛍光タンパクを Rohon-Beard ニューロンに発現させ、刺激を与えた時に Rohon-Beard ニューロンが活動するか (カルシウムイオンの一過的上昇が見られるか) を可視化したところ、正常個体では Rohon-Beard ニューロンの活動が観察されたが、変異体では蛍光強度の上昇が見られず、Rohon-Beard ニューロンが刺激受容時に活動しないことが確認された。ゼブラフィッシュ

の皮膚を剥がし、筋組織を取り除くと神経組織に微小電極で直接アクセスできるようになり、Rohon-Beard ニューロンの活動を電気生理で記録することが可能になるが、正常個体の Rohon-Beard ニューロンをパッチクランプし、パッチ電極から通電させると活動電位を発生させられるが、変異体ではどれだけ通電しても活動電位は発生しなかった。さらに、電位固定により、ナトリウム電流を記録すると、正常な Rohon-Beard ニューロンでは閾値電位を越えたときにナトリウム電流が記録されたが、変異体の Rohon-Beard ニューロンでは全く記録されなかった。一方で、フグ毒のテトロドトキシンで電位依存性ナトリウムチャネルを阻害した条件で電位固定を行い、カリウム電流を記録すると正常な Rohon-Beard ニューロンでも変異体の Rohon-Beard ニューロンでも同程度のカリウム電流が記録された。これらの電気生理の結果は変異体の Rohon-Beard ニューロンでは電位依存性カリウムチャネルは正常だが、電位依存性ナトリウムチャネルに異常があり、活動電位を発生させられないことが分かった。変異体の責任遺伝子は RNF121 という遺伝子で premature なストップコドンができるナンセンス変異が見つかったが、RNF121 は膜貫通領域を 6 つ有する膜タンパクで、リングフィンガー型ユビキチンリガーゼドメインをもつので、何らかの基質をユビキチン化し、その基質をプロテアソームによる分解へ仕向けるはたらきがあると予想された。アンチセンスモルフォリノを用いたノックダウンで正常なゼブラフィッシュで RNF121 の発現を阻害すると、触刺激に応答なくなり、逆に変異体に RNF121 を強制発現させると触刺激に応答するようになることから、変異体の責任遺伝子が RNF121 であることが確認できた。RNF121 は脊椎動物で保存されている遺伝子だが、ヒト HEK293 細胞には RNF121 は発現しておらず、HEK293 細胞に RNF121 を発現させて抗 RNF121 抗体を用いた免疫染色で細胞内存在部位を調べると、RNF121 は小胞体の膜に局在することが分かった。さらに HEK293 細胞を用いたリコンビナント発現系を用いた解析から、RNF121 は電位依存性ナトリウムチャネル Nav1.6 をユビキチン化して分解を促進することが分かった。一方で、RNF121 は Nav1.6 の細胞膜への細胞内輸送を促進するという、一見矛盾するように思える結果も得られた。Nav1.6 は Scn1b というアクセサリサブユニットとゴルジ体で会合して細胞膜の軸索起始部へ輸送されて電位依存性ナトリウムチャネルとして働くことが知られており、Scn1b は Nav1.6 の細胞膜への輸送を促進することが報告されている。RNF121 変異体では Nav1.6 の膜局在に異常が出るが、変異体に Scn1b を過剰発現させると、この異常の緩和が見られた。以上のことから、以下の仮説が支持される。Nav1.6 は膜貫通ドメインを 24 個もち、220kD を超える分子量を有する巨

大なタンパクで、タンパク質の折りたたみ異常を起こしやすく、小胞体において一定の確率で折りたたみ異常の不良品となる。RNF121は不良品 Nav1.6 をユビキチン化し、プロテアソームによる分解へ仕向けるので、正常に折りたたまれた Nav1.6 だけがゴルジ体へ輸送され、ゴルジ体で Nav1.6 は Scn1b と会合し、細胞膜へ輸送される。しかし、RNF121 変異体では不良品 Nav1.6 が分解されないまま小胞体に蓄積し、これが Scn1b と会合して小胞体にとどまるので、Scn1b は不良品 Nav1.6 に奪われ、結果的に正常に折りたたまれた Nav1.6 と会合できる Scn1b が不足し、Nav1.6 を細胞膜へ輸送することができなくなる。このことから RNF121 は Nav1.6 の品質管理を行い、Nav1.6 の膜局在を制御し、これが触覚受容に必要であることが明らかになった。

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9件)

1. Kotani, Y., Morito, D.*[,] Yamazaki, S., Ogino, K., Kawakami, K., Takashima, S., Hirata, H.* and Nagata, K.* (2015) Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, mysterin/RNF213. *Sci. Rep.* 5: 16161. (*Corresponding authors)
2. Ogino, K., Low, S. E., Yamada, K., Saint-Amant, L., Zhou, W., Muto, A., Asakawa, K., Nakai, J., Kawakami, K. Kuwada, J. Y. and Hirata, H.* (2015) RING finger protein 121 facilitates the degradation and membrane localization of voltage-gated sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 2859-2864. (*Corresponding author)
3. Stödberg, T.*[,] McTague, A.*[,] Ruiz, A. J.*[,] Hirata, H.*, Zhen, J., Long, P., Farabella, I., Meyer, E., Kawahara, A., Vassallo, G., Stivaros, S. M., Bjursell, M. K., Stranneheim, H., Tigerschiöld, S., Persson, B., Bangash, I., Das, K., Hughes, D., Lesko, N., Lundeberg, J., Scott, R. C., Poduri, A., Scheffer, I. E., Smith, H., Gissen, P., Schorge, S., Reith, M. E. A., Topf, M., Kullmann, D. M., Harvey, R. J., Wedell, A. and Kurian, M. A. (2015) Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Nature Commun.* 6: 8038. (*Co-first authors)
4. Watatane, T., Shimazaki, T., Mishiro, A., Suzuki, T., Hirata, H., Tanimoto, M. and Oda, Y. (2014) Coexpression of auxiliary Kvb2 subunits with Kv1.1 channels is required for developmental acquisition of unique firing properties of zebrafish Mauthner cells. *J. Neurophysiol.* 111: 1153-1164.
5. Hirata, H.*, Ogino, K., Yamada, K., Leacock, S. and Harvey, R. J. (2013) Defective escape behavior in DEAH-box RNA helicase mutants improved by restoring glycine receptor expression. *J. Neurosci.* 33: 14638-14644. (*Corresponding author)
6. 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., Gecz, J., Schuelke, M., Laumonier, F. and Kalscheuer, V. M. (2013) Mutations of ZC4H2 are associated with arthrogyriposis multiplex congenita and intellectual disability and through impairment of central and peripheral synaptic plasticity. *Am. J. Hum. Genet.* 92: 681-695. (*Co-first authors)
7. Horstick, E. J., Linsley, J. W., Dowling, J. J., Hauser, M. A., McDonald, K. K., Ashley-Koch, A., Saint-Amant, L., Satish, A., Cui, W. W., Zhou, W., Sprague, S. M., Stamm, D. S., Powell, C. M., Speer, M. C., Franzini-Armstrong, C., Hirata, H.* and Kuwada, J. Y.* (2013) Stac3 is a component of the excitation-contraction coupling machinery and mutated in Native American myopathy. *Nature Commun.* 4: 1952. (*Corresponding authors)
8. 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. (*Corresponding author)

9. Satou, C., Kimura, Y., Hirata, H., Suster, M. L., Kawakami, K. and Higashijima, S. I. (2013) Transgenic tools to characterize neural properties of discrete populations of zebrafish neurons. *Development* 140: 3927-3931.

〔学会発表〕(計14件)

1. 平田普三。ゼブラフィッシュを用いた運動器の遺伝学的解析。第4回骨格筋生物学研究会。松本大学(松本)。2016年3月5日。
2. Hirata, H. Plasticity of glycinergic synapses and related behaviors in zebrafish. The 25th meeting of the International Society for Neurochemistry. Cairns Convention Center. Cairns, Australia. August 24, 2015.
3. 平田普三。電位依存性ナトリウムチャネルの輸送における GPI アンカータンパク生合成の重要性。第34回日本糖質学会年会。東京大学安田講堂(東京)。2015年8月2日。
4. Hirata, H., Ogino, K. and Yamada, K. Plasticity of glycinergic synapse in zebrafish. The 6th Strategic Conference of Zebrafish Investigators. Asilomar Conference Center. California, USA. January 19, 2015.
5. Hirata, H. Plasticity and visualization of glycinergic synapse in zebrafish. The 3rd International Institute for Advanced Studies Conference of Novel Developments on the Study of Life and Biological Systems Based on Genome Engineering and Imaging Science. 国際口頭研究所(木津川)。2014年10月29日。
6. Hirata, H. Motor development and plasticity in zebrafish. Core-to-Core Project International Seminar "Evolution of insulin-like peptides and their function: development, growth metabolism and aging." 東京大学中島董一郎記念ホール(東京)。2014年10月11日。
7. 平田普三。運動システムの遺伝的プログラムと可塑性～ゼブラフィッシュを用いた運動・行動の研究～。第6回 Neuroprotective Meeting for Young Researchers (NMYR6)。シェラトン都ホテル東京(東京)。2014年10月4日。
8. 平田普三。ゼブラフィッシュの動きにお

けるグリシン作動性シナプスの重要性。第20回関西小型魚類研究会定例会。理化学研究所・生命システム研究センター大会議室(大阪)。2014年1月24日。

9. Hirata, H. Formation of glycinergic synapse in zebrafish. The 6th Asia Oceania Zebrafish Meeting. Hong Kong University of Science and Technology. Hong Kong, China. January 21, 2014.
10. 平田普三。グリシン作動性シナプス可塑性の動作原理と生理的意義。国立遺伝学研究所研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」。国立遺伝学研究所講堂(三島)。2013年12月20日。
11. 平田普三。ユビキチンリガーゼ RNF121 による Nav の品質管理と局在制御。国立遺伝学研究所研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」国立遺伝学研究所講堂(三島)。2013年12月19日。
12. Hirata, H., Ogino, K., Yamada, K., Leacock, S. and Harvey, R. J. Molecular basis for developmental acquisition of unique firing property of Mauthner cell in zebrafish. 第19回小型魚類研究会。情報産業プラザ(仙台)。2013年9月20日
13. Hirata, H., Ogino, K., Yamada, K., Leacock, S. and Harvey, R. J. DEAH-box RNA helicase Dhx37 plays an essential role in the biogenesis of GlyRa subunit mRNAs and is indispensable for normal escape behavior. The 8th European Zebrafish Meeting. Palau de Congressos de Catalunya. Barcelona, Spain. July 12, 2013.
14. 平田普三。発生期のグリシン作動性シナプスの活動依存的形成とその機能。熊本シンポジウム 2013。熊本大学発生医学研究所(熊本)。2013年6月25日。

〔図書〕(計3件)

1. 平田普三。グリシンとグリシン受容体の機能。臨床神経科学 2015年(Vol. 33) 1月号、p66-70。
2. 平田普三。Wieacker-Wolff 症候群。別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No. 29 神経症候群(第2版) p458-461。日本臨床社。2014年9月20日発行。
3. 平田普三。脊椎動物の運動システムの発達。生化学 2013年(Vol. 85) 4月号、p235-243。

〔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

平田 普三 (HIRATA HIROMI)
青山学院大学・理工学部
教授
研究者番号：60402450

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし