

課題番号 21

初期新口動物ウニの神経系形成における ハンチントン病遺伝子の作用解析-1

[1] 組織

代表者：清本 正人
 (お茶の水女子大学 湾岸生物教育研究センター)
 対応者：小掠 利彦
 (東北大学加齢医学研究所)
 分担者：加藤 秀生
 (東北大学名誉教授)

研究費：物件費 20 万円，旅費 10 万円

[2] 研究経過

本研究の目的・概要：ヒトの神経疾患の代表例の一つに舞踏運動や認知疾患を伴うハンチントン病がある。動物進化の中で、ハンチントン病遺伝子(HD)はヒトが属する新口動物ではウニを含む棘皮動物に既に認められている(図1)。しかし、病原とされるグルタミン酸リピート(Poly-Q)はウニでは見られるが、さらに直上のホヤには認められていない。さらに、ハンチントン病タンパク(Htt)発現細胞が動物発生のどの時期にどのような胚葉細胞に起源を持つのかも不明である。また、病変を起こす前のHttの機能にGABA神経系形成への関与は知られているが、不明な点も多く残されている。一方、ウニではGABA細胞の細胞系譜がかなり解明されていることから(Katow et al. 2014)、Httに関する多くの疑問に答え得る。そこで、ウニ幼生のGABA作動性神経系形成をモデルとしてこれらの疑問を解明することを目的とした。このために、当初、ウニのゲノムプロジェクトで登録されているウニHDの塩基配列を元にタンパク構造を求め、そこから特異性を担保できる免疫抗原とするアミノ酸配列をいくつかのプロテオミクデータベースを用いて選定する。以下、研究活動状況の概要を記す。

本研究計画発足後直ちに、この免疫抗原に対する抗体を作成し、免疫ブロッティングと免疫組織化学により、その特性を解析する。その後、ウニ卵を本申請者と共同研究者が所属する研究センターで初期胚から変態直前までの後期幼生まで培養し、これらを用いて発生各段階毎のウニHtt発現動態を明らかにする。特にHtt発現特性の一つであるGABA神経系形成との関連に注目する。ウニHttの発現部位

解析結果はH30年度に予定するHDのノックダウンによる機能解析研究の実験計画の根拠になる。

免疫組織化学解析では高精度の抗原分布解析が極めて重要であることから、加齢研共通機器管理室にある共焦点レーザー顕微鏡と三次元構築ソフト(Amira)を用い、この時、またはその前後に、面接またはメールで随時加齢研対応者である小掠教授と観察結果等の意見交換・今後の研究方向の打ち合わせを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

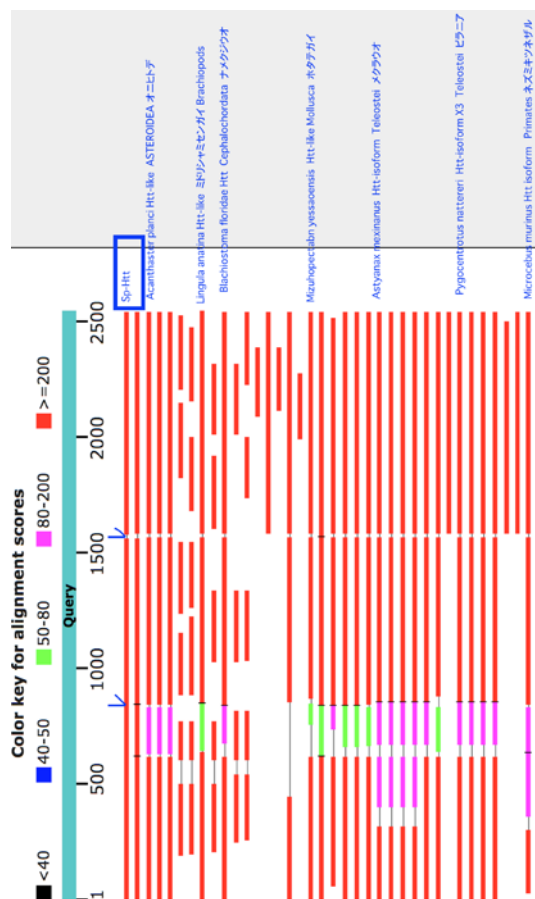


図1 ウニ Htt (Sp-Htt, 青色ボックス)と類似アミノ酸配列を持つ動物 Htt との alignment 比較。✓;ウニゲノム解析時の分割領域。

まず第1に、ウニ Htt (図1) はゲノムプロジェクトでは N 末端側配列、中間部配列、そして C 末端

側配列の3部に分けて登録されていた。そこで、3つの配列を統合した配列(2,543 アミノ酸、 $M_r=280$ kDa)をBLASTに掛けた。この配列には2箇所欠落部分が入った構造になっているが(図1左✓記号)、これはゲノムプロジェクトでの分害配列決定作業で抜け落ちた結果と考えられる。このためかウニ Htt はヒトデ(2,975 アミノ酸)より短い、極めて近い構造であり、哺乳類(図1右端)を含めて他の動物種にも近い構造を保存していた。ウニ HD 配列の中にハンチントン病の原因とされる正常ヒト HD では20数回以上繰り返される CAG 配列が、ウニでは1回反復が1箇所(2185C-2190G)にのみ認められた。

第2に、ウニ Htt の抗体をウサギで作製し、発生段階毎の発現動態を免疫ブロッティングで解析した。これによると相対分子量 168.4kDa のバンドとより高分子量の複数が検出された。これはヒト Htt でも観察されているカスパーゼ切断によると考えられる。Htt は間充細胞胚から中期原腸胚まではより高分子量のバンドが見られ、プリズム幼生期からは 168.4kDa バンドが顕著になり、高分子量ものは認められなくなる。次いで、ウニ Htt の発現領域の全胚免疫組織化学解析では、間充細胞胚期から外胚葉に陽性細胞が現れ、プリズム幼生期にかけて胞胚腔中にも陽性細胞が認められる。この発現動態は GAD 発現細胞の出現パターンに極めて似ている(Katow et al. 2014)。次に、GABA 神経系の繊毛帯付随線条体(CBAS)のマーカートンパクであるセロトニン受容体(5Hthpr)との二重染色を行った。Htt は GABA 神経系形成に関わっていると考えられているが、ウニでも両者の関係が見られた(図2)。

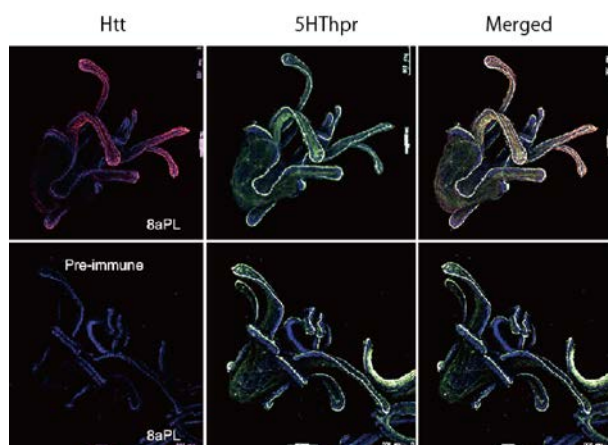


図2 8腕プルテウス幼生(8aPL)の Htt (赤) の発現パターン。5Hthpr(緑)。

最後に、稚ウニでの Htt 発現パターンの解析では、ウニの運動器官である管足に GABA と一緒に検出された(図3)。

以上の今年度の解析ではウニ Htt 発現細胞は外胚葉由来であり、遊泳能力が発達した幼生期には運動器官である繊毛帯に付随した CBAS で(Katow et al. 2018, 投稿中論文)、成体の匍匐移動期間にはその運動器官である管足で GABA と近接して発現する。

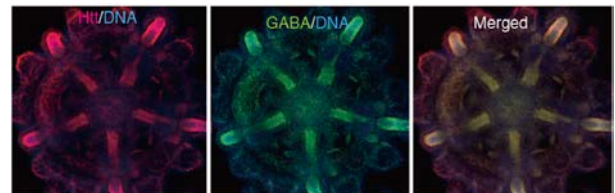


図3 稚ウニにおける Htt(赤)と GABA (緑) の一次管足における発現パターン。

(3-2) 波及効果と発展性など

以上のように、Htt は運動器官である GABA 作動性の CBAS に強く発現する。従って、GABA 発現低下を伴い、ヒトを含む poly-Q 形成を伴う脊椎動物等でのハンチントン病発症機構を解析するモデルとしてウニが期待される。次年度に予定している HD ノックダウンの影響解析によって、進化上ウニ類の直上に位置するホヤ類での CAG リピード配列欠如の進化的意味等を明らかにできる可能性がある。また、逆に、ウニに CAG リピードを大量に含む組み換え遺伝子を挿入して、Poly-Q 発現を大幅に亢進させた影響が CBAS での GAD 発現阻害として現れるか否かは現在の手法で容易に解明できるので、より発展した研究領域の展開が期待されている。

[4] 成果資料

- (1) 加藤秀生, 上村伊佐緒, 吉田裕美, 清本正人 (2017a) 「ウニ幼生繊毛帯付随線条体(CBAS)における Tjp1 の発現」日本動物学会・平成 29 年度東北支部大会 (青森・東北大学・浅虫海洋生物学教育研究センター)
- (2) 加藤秀生, 吉田裕美, 清本正人, 上村伊佐緒 (2017b) ウニ幼生繊毛帯付随線条体 [Ciliary Band-Associated Strand (CBAS)]におけるシナプトフィジンの発現。第88回日本動物学会大会 (富山大学)
- (3) Hideki Katow, Hiromi Yoshida, Tomoko Katow and Masato Kiyomoto (2018) Ontogeny of a synaptophysin-mediated GABA transmission mechanism from the ciliary band-associated strand to the ciliary band during development of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. (投稿中)