

課題番号 14

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-2

[1] 組織

代表者：清本 正人

(お茶の水女子大学 基幹研究院自然科学系
湾岸生物教育研究センター)

対応者：小椋 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 11 万円，旅費 4 万円

[2] 研究経過

本研究計画の初年度で作成した抗バフンウニ・ハンチントン病タンパク (Htt) 抗体陽性細胞の出現時期と部位に注目して、Htt 陽性細胞の形成起源と幼生運動器官形成との関係を以下のように解析した。①免疫ブロッティング (IB) により Htt が検出される時期を孵化直後から幼生運動器官が明らかになる 4 腕プルテウス幼生期までの解析、②IB で検出される最初期の間充細胞胚期での陽性細胞の分布を多重染色した免疫組織化学での観察と細胞内分布の 3 次元構築した免疫組織化学像解析、③本研究計画初年度で報告したように、GAD 発現細胞 (GADC) から構成される繊毛帯付随線条体 (CBAS) 領域にも Htt が検出されることから、初期胚上皮から由来する間充細胞性の GADC (Katow et al. 2014) での発現の可能性をプリズム幼生で解析、最後に、④GABA 神経系とは別に、同様に幼生の運動制御に深く関わっているセロトニン (5HT) 神経系と Htt 陽性細胞の組織分布解析を行なった。

以上のように、本免疫組織化学解析では多面的な抗原分布の把握を求められるので、前回同様に、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、さらに加齢研対応者である小椋教授との面接またはメールによる観察結果等の意見交換・今後の研究方向の打ち合わせを随時行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す 5 項目の研究成果を得た。

1. IB による発生過程での発現パターンと初期胚細胞

での Htt 発現：IB 解析から、Htt は間充細胞胚から検出でき、原腸胚で一時的に中断した後、4 腕プルテウス幼生まで相対分子量 168 kDa 領域に継続して認められた (図 1A)。最初期の Htt は間充細胞胚の上皮細胞と胞胚腔細胞に検出された。一方、この時期に現れる一次間充細胞 (PMC) には検出されない (図 1B)。さらに、Htt 陽性胚上皮細胞中では Htt は細胞質中で斑点状に認められた (図 1C、挿入図は図中の白枠部分を拡大したものの)。

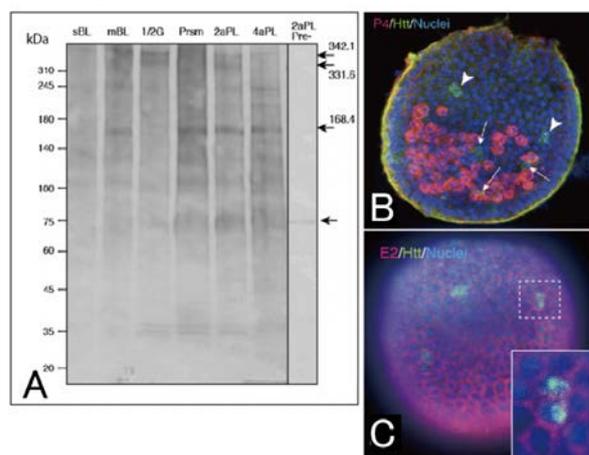


図 1 (A) 右端のレーンは陰性コントロールの免疫前血清。(B) 間充細胞胚。PMC (赤)。Htt 陽性間充細胞 (緑、矢印) と Htt 陽性上皮細胞 (緑、矢尻)。(C) 間充細胞胚の上皮細胞に検出された Htt (緑)。右下は四角両機の拡大図。

2. 胚上皮から由来する Htt 陽性細胞群：

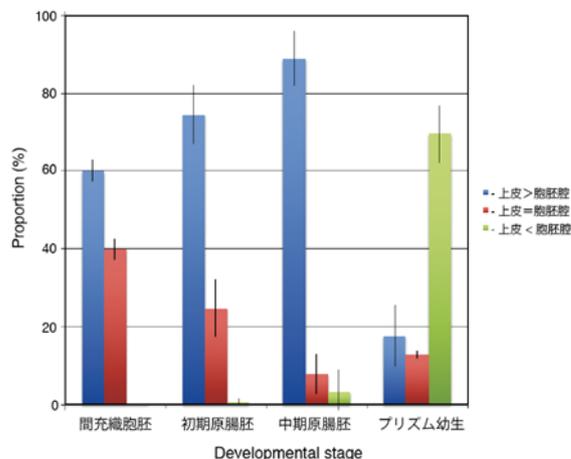


図 2 Htt 陽性細胞の上皮と胞胚腔での組織分布頻度 (N=108)。

初期発生期間中、当初胚上皮中に現れた Htt 陽性細胞の割合は増加するが、プリズム幼生期には圧倒的に多くの Htt 陽性細胞は胞腔空に見られた (図 2)。しかし、この後、胞腔空の GADC の幼生体表への移出過程が始まり、それに伴って、CBAS 形成が進行する (Katow et al. 2016)。

3. 細胞核内とその周辺での発現: 胚上皮細胞中で検出された Htt 陽性斑点は共焦点レーザー顕微鏡像解析では細胞核内と近傍の細胞質内に認められた (図 3A)。さらに、これを三次元構築し、光学的な切片を作成した解析によると、Htt 陽性斑点は細胞核内から周辺の細胞質内へと連続して認められた (図 3B)。

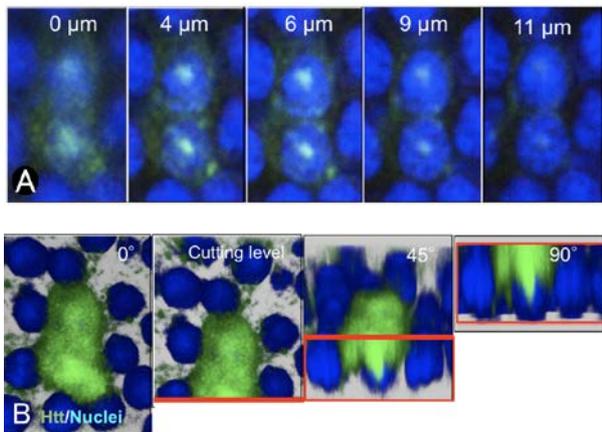


図 3 細胞内の Htt 陽性分布。(A) 共焦点レーザー顕微鏡像の光学切片 (各切片の距離は上に示している) (B) 三次元構築図。数値は画像の回転角度。赤枠は断面。

4. GADC の Subgroup における Htt の初期発現: 本研究計画初年度で明らかにしたように、CBAS は Htt も発現する GADC から構成されているが、この GADC がいつから Htt も発現するかをプリズム幼生で解析したところ、全ての GADC が Htt を発現しているのではなく、GADC サブグループが Htt を発現していることが明らかとなった (図 4、矢印)。

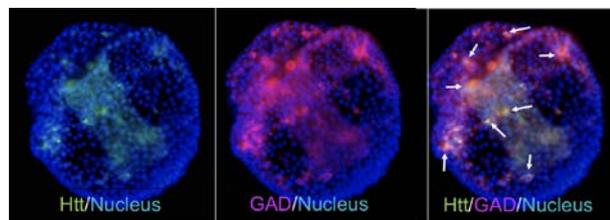


図 4 プリズム幼生胞腔空の GAD/Htt 陽性細胞 (矢印) 分布。

5. 5HT とは異なる部域での Htt 発現: GABA と並んで繊毛運動制御に関わっている 5HT 神経系との組織的位置関係を 5HT 神経節が形成される 4 腕プルテウスで解析した。その結果、5HT 陽性細胞と Htt 陽性細胞は独

立していることが示された (図 5A)。4 腕プルテウス幼生 CBAS のセロトニン受容体 (5HT₁Thpr) 発現細胞では Htt 発現も認められた (図 5B, C)。以上から、Htt は繊毛運動機構・形成に関与していると考えられる。

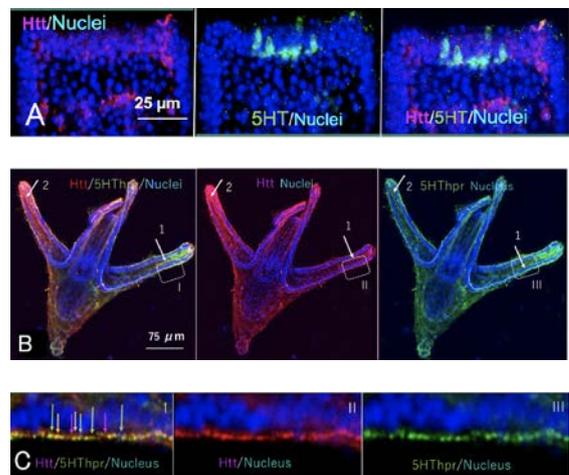


図 5 (A) 2 腕プルテウス幼生の 5HT 神経節 (緑) には Htt (赤) は検出されない。(B) 4 腕プルテウス幼生の 5HT₁Thpr 発現 CBAS。(C) (B) 中の四角部分の拡大図。

(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 作動性繊毛帯を構成する CBAS に強く発現する。これは前年度本研究報告での稚ウニ管足での Htt 陽性領域の存在観察と共に、HD をノックダウンできる Morpholino を適用することで、ヒト・ハンチントン病の一つの特徴である運動機能障害の機構を解明できると期待される。同時に、Htt が本来果たしている機能を動物の進化の観点から解明できると期待される。

[4] 成果資料

(1) 加藤秀生, 加藤知子, 清本正人 (2018) 「ウニの発生におけるウニ・ハンチントン病タンパクの発現動態」日本動物学会大会(北海道大学・札幌)

(2) Katow H, Katow T, & Kiyomoto M. (2018) The ontogeny of synaptophysin expression patterns on the GABAergic ciliary band-associated strand during larval development of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* A. Agassiz, 1864. *Zoology*. <https://doi.org/10.1007/s00435-018-0424-9>

(3) Katow H, Katow T, Yoshida H, Kiyomoto M, & Uemura I. (2016) Immunohistochemical and ultrastructural properties of the ciliary band-associated strand (CBAS) in sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* larva. *Frontiers Zool* 13:27 DOI 10.1186/s12983-016-0