

課題番号 4

ウニ幼生後期から変態までの発生と運動能における ハンチントン病遺伝子の作用機構-1

[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 10 万円

[2] 研究経過

本研究計画初年度において、過去に報告したバフンウニ・ハンチントンタンパク (Hp-Htt) の分子構造的解析が不十分であったことを踏まえ、先ず免疫ブロッティングを新規に作成した試料を用いて解析を行なった。さらに、先に明らかにした形態形成における組織化学的発現動態が幼生の遊泳運動に繊毛運動を介して関与していることを、対照臓器の範囲を広げながら、さらに個々の細胞レベルまで下げた解析を行なった。また、Hp-Htt モルフォリノ (Hp-Htt-MO) 投与が幼生の遊泳運動を阻害し運動器官である繊毛帯での繊毛運動を低下させるだけでなく、繊毛帯へのシグナルを送っていると考えられる繊毛帯附置線状構造 (Ciliary band-associated strand, CBAS) 内での Hp-Htt 発現を阻害することを見出した。さらに、幼生の運動器官以外の繊毛構造が胃壁内側にもあるが、それ等の上皮細胞中にも Hp-Htt を見出した。しかし、幼生の頂端部にある長い不動繊毛からなる頂毛 (apical tuft) 上皮中には認められなかった。したがって、Hp-Htt は運動性の繊毛細胞に関与していると考えられる。本研究者はデータ解析で加齢研・共通機器管理室にある共焦点レーザー顕微鏡を使用する都度及び随時 E-メールで対応者の小椋利彦教授とは連絡を取りながら遂行してきた。

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、以下に示す研究成果を得た。

(1) Hp-Htt の免疫ブロッティングと免疫組織化学による継時的発現パターンの変化の観察

Hp-Htt は繊毛運動により活発に遊泳行動を示す遊泳胞胚期からプリズム幼生期まで 350kDa 領域に 1 本の陽性バンドとして検出された。これは従来ウニのゲノムデータベースでは N-末、中間部、C-末として別個に報告されており、Htt 全体の姿が見えなかった。しかし、今回の解析でヒト Htt とほぼ同じ分子量を持つ巨大タンパクであることが確認できた。さらに、初期発生中ではあるが、発生途中の 2 腕プルテウス幼生期から分子構造が変化し、一部の抗原ペプチド配列を含む N-末構造を含む領域が分離して、より低分子の 165kDa のフラグメントが追加的に現れた (図 1)。類似の現象は脊椎動物でも報告されている。また、350kDa バンドが当初 1 本だけ見られる時期が上皮細胞核内に発現中でもあることから、発生初期には核内発現が中心になっていると考えられる。しかし、更に発生が進むと前回報告したように、CBAS 細胞質中に見られることから、核内から細胞質へと移動しており、165kDa 領域の出現がこのことと関係している可能性が考えられる。

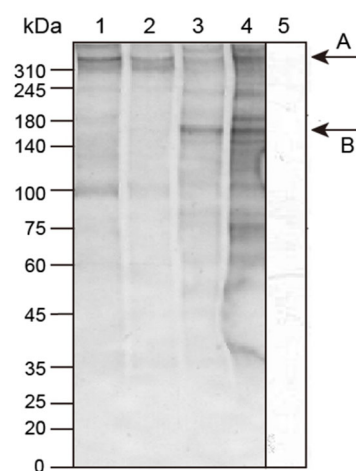


図 1. 免疫ブロッティングによる遊泳胞胚(レーン 1)から 4 腕プルテウス幼生(レーン 4)までの Hp-Htt の発現動態。当初は遊泳胞胚期からプリズム幼生期(レーン 2)までは 350kDa 領域に認められる(矢印 A)が、2 腕幼生(レーン 3)からは、165kDa 領域に新たに陽性バンドが現れ(矢印 B)、4 腕プルテウス幼生(レーン 4)に続く。レーン 5 は 4 腕プルテウス幼生を免疫前血清で処理した陰性コントロール。

(2) Hp-Htt-MO による形態形成阻害

Hp-Htt は 2 腕プルテウス幼生から、繊毛帯に沿って分布する CBAS の軸索細胞質中に存在するが(図 2A、矢印)、Hp-Htt-MO を投与された幼生ではその発現領域が分断される(図 2B、矢印)。さらに、運動性繊毛を持つ消化管内壁細胞中にも Hp-Htt が認められる(図 2C 挿入図)。しかし、非常に長い繊毛からなる幼生頂端部の長毛基部上皮には Hp-Htt は認められない(図 2C、点線で囲まれた四角)。これらの組織化学観察から、運動性繊毛の存在部位と Hp-Htt の発現部位は重なっている。

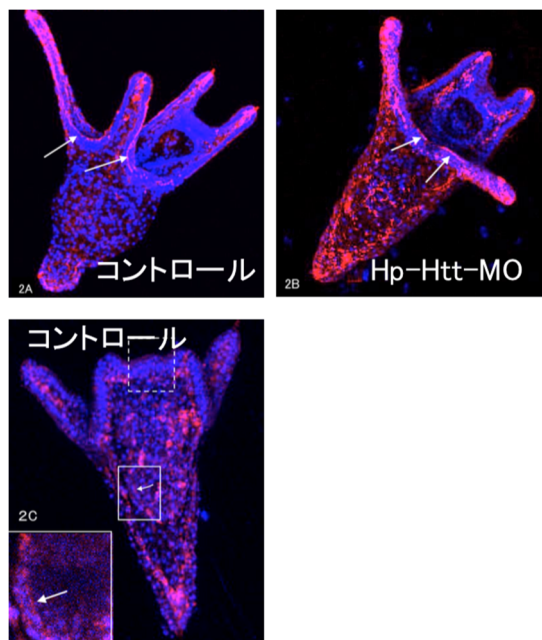


図 2. Hp-Htt-MO の CBAS 形成への阻害効果。4 腕プルテウス幼生では Hp-Htt を発現する CBAS が幼生腕間を結んでいる(2A、矢印)。一方、Hp-Htt-MO を投与された同じ発生時期の幼生の CBAS は分断されている(2B、矢印)。CBAS 以外に、幼生頂部(2C、破線四角)に長い繊毛束があるが、そこに Hp-Htt は認められない。一方、消化管内壁には長い運動性繊毛があるが、その頂部には Hp-Htt が認められる(2C、長方形、矢印および挿入図、矢印)。

(3) Hp-Htt-MO 処理による繊毛渦の種類および発生数の減少。

Hp-Htt-MO 処理された胞胚の運動はほとんど影響が見られないが、幼生は培養皿底面で静止したままか、非常にゆっくりとしか泳ぎ回らない。正常 2 腕以上の幼生は幼生腕周辺を中心として体表周辺に 2 個から 6 個の多種類の繊毛運動渦を生ずるが、Hp-Htt-MO によって、その数、種類とも著しく減少する(図 3)。以上の結果は幼生運動性繊毛の機械的構成成分としてよ

りもシグナル伝達経路に Hp-Htt が関与していると推測される。

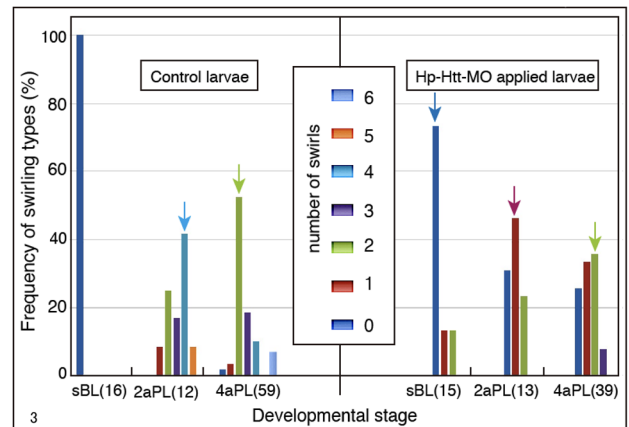


図 3. 遊泳胞胚から 4 腕プルテウス幼生までの遊泳運動に伴う、繊毛渦の種類と数に及ぼす Hp-Htt-MO 抑制効果。左側：コントロール、右側：Hp-Htt-MO 処理。中央の 6 色の四角を形成された繊毛渦の数。

3-2) 波及効果と発展性など

本プロジェクト発足以来海外のハンチントン病等に関する国際会議への招待が多数来ているが、今年度はコロナウイルスの蔓延で、開催がほとんど見送られている。これが、落ち着すれば、将来はそれ等に貢献したい。ウニ成体での解析等、今後の発展が投稿依頼雑誌の増加として現れていることから、期待されている。

[4] 成果資料

- (1) Katow, H., Katow, T., Kiyomoto, M. (2019) 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. **Zoomorphology** 138:117–126 <https://doi.org/10.1007/s00435-018-0424-9>
- (2) Katow, H., Yoshida H., Kiyomoto, M. (2020) initial report of γ -aminobutyric acidergic locomotion regulatory system and its 3-mercaptopropionic acid-sensitivity in metamorphic juvenile of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Scientific Reports** 10:778 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57567-w>
- (3) Katow, H., Abe, K., Katow, T., Yoshida, H., Kiyomoto, M. (2020) Involvement of Netrin/Unc-5 Interaction in Ciliary Beating and in Pattern Formation of the Ciliary Band-Associated Strand (CBAS) in the Sea Urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Int.J.Mol.Sci.** 2020.,21, 6587; 6587; doi:10.3390/ijms21186587