

課題番号 1

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-3

[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 18 万円

[2] 研究経過

本研究・開発は、ヒトの遺伝子異常による重篤な神経変性疾患の原因であるハンチントン病遺伝子(Htt)の進化的機能を知るために企画した。Htt の作用解明は近年ますますその重要性を増している。この遺伝子を持つ進化上最も原初的な動物が本研究材料であるウニ類 (Hp-Htt) であり、遺伝子疾患の原因とされる N 末側の過度に重複したグルタミンをコードする配列はこの動物種にも存在することを Zuccato 等(2010) が発表した。そこで、Htt が本来担っていると考えられる機能を解明することを目的として研究を行った。この遺伝子産物は本研究者が従来扱ってきた GABA 神経系機能を阻害することから、これまでのウニにおける GABA 神経形成知見を元に、この遺伝子産物の原初機能を明らかにすることを目的として 3 年前に開始した。本最終年度では Hp-Htt が運動器官である幼生腕繊毛帯繊毛の運動に関与していることを報告する。

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。

まず第1に、Hp-Htt のノックダウンがウニ幼生の運動能に及ぼす影響を Hp-Htt アンチセンス・モルフォリノ(Htt-MO)を胚に注入して解析した。Hp-Htt 遺伝子の機能に大きく影響すると考えられている N 末側塩基配列 ATGAAGATTTATCTCAAAGGCAATA の アンチセンスオリゴ

TATTGCCTTTGAGATAAATCTTCAT (GeneTools 社) の 3'側にフルオレッセイン (緑色蛍光) を結合させて、幼生組織内への進入をトレースできるようにした。導入剤としては Endo-Porter PEG (GeneTools 社) を用いた。まず、この導入剤の機能を Dextran B/PEG で検定し、Dextran B が幼生内に導入されることを確認した (図 1A)。次いで、蛍光標識 Htt-MO/PEG が幼生体内に導入されることを確認した (図 1B、矢印)。

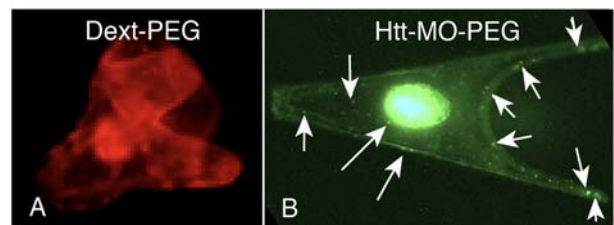


図1. 4腕プルテウス幼生に取り込まれた Dextran B (A) と幼生上皮と胞胚腔細胞内の Htt-Morpholino (B、矢印)。中央の大きな円は胃に取り込まれた蛍光。

次に幼生の運動器官である繊毛運動を直径 6~7µm の珪藻 (*Chaetoceros gracilis*) を幼生の周りに滴下し、暗視野顕微鏡で3~4秒間露光して記録した渦流数で検証した。その結果、幼生は周辺に数個の渦流を発生させるが、その数は Htt-MO によって減少した (図 2A)。PEG 単独での影響は多少見られたが、Htt-MO による渦流数は統計的に有意の差 ($P=0.018<0.05$)であった (図 2B)。

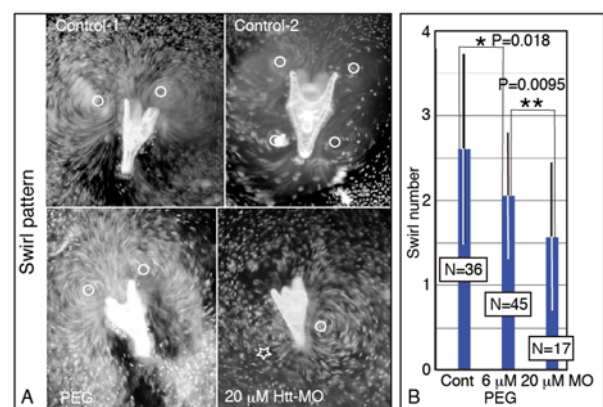


図2. 4腕幼生体表面での渦巻き (丸印) 形成。(A) Htt-MO 処理幼生では渦流数が少なく、いびつ (星型) になっている。(B) Htt-MO では有意に渦流数が減少。囲み中の数字はサンプル数。

次に、繊毛帯が最も発達している幼生腕の形態を見ると Htt-MO 導入幼生では発生初期に形成される

Postoral arms で有意に伸長が遅れ(図3、 $P < 0.05$)、一方、4腕プルテウス期に作られる Anterolateral arms ではその差がほとんどなかった(図3、 $P > 0.05$)。

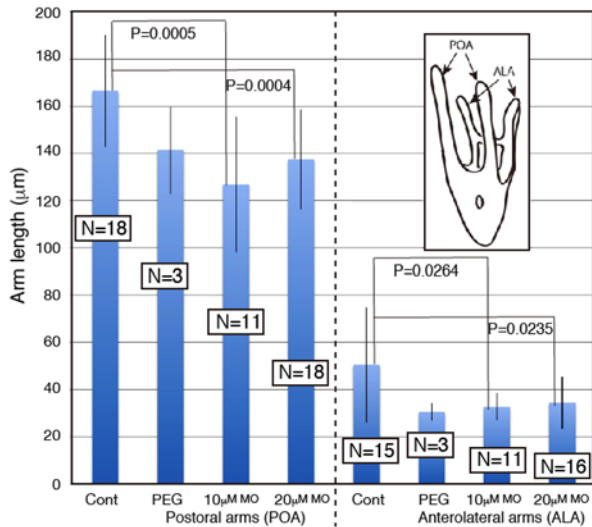


図3. 4腕プルテウス幼生の Postoral arm (POA)は Htt-MO により伸長が阻害されるが、Anterolateral arm (ALA)にはそれは顕著ではない。P 値のない関係は統計的に有意差がないもの。囲み中の数字はサンプル数。

最後に、腕の長さへの阻害効果が Hp-Htt の細胞増殖阻害による可能性を BrdU 取り込みで解析した。正常幼生では腕全長にわたって活発な細胞増殖が見られるが(図4A)、Hp-Htt-MO 導入幼生ではまばらにしかそれが見られない(図4B、C)。一方、PEG 処理のみの幼生での BrdU 取り込みは見えていないが、幼生腕の長さに顕著な減少は認められない(図4D)。さらに、Hp-Htt を持つ繊毛帯附置線条体 (CBAS) では、Hp-Htt-MO によってその発現が抑制されている(図4、B、C、矢印)。一方、PEG 単独導入幼生は正常な CBAS 内 Hp-Htt 発現が見られる(図4、D、矢印)。

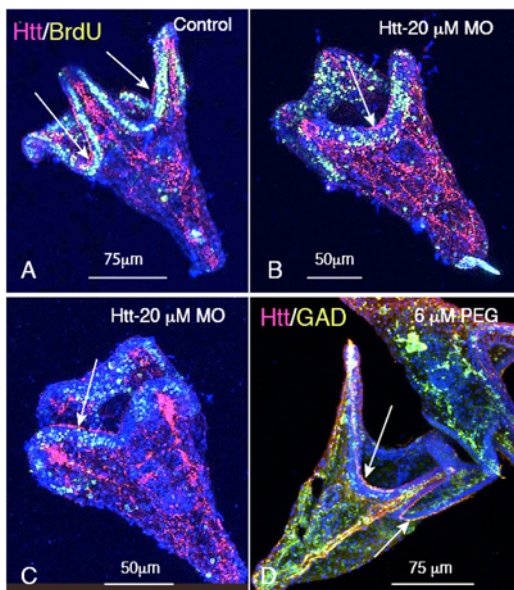


図4. 4腕プルテウスへの BrdU 取り込み部位(緑) 正常幼生(A)、Htt-MO 幼生(B、C)、PEG 単独導入幼生(D)。

以上の結果から、Hp-Htt はヒト Htt 同様に、細胞増殖、繊毛運動とそれによる幼生の遊泳運動に関わっていると考えられる。また、Hp-Htt ノックダウンによる上記の障害は CBAS が出来上がる幼生の腕が伸長する2腕後期から4腕プルテウス期にかけて顕在化することから CBAS での Hp-Htt 発現減少も生じることを鑑みると、Hp-Htt/CBAS の機能が重要と考えられる。

(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るようになっていたので、将来はそれ等に貢献したい。ウニ成体での解析等、今後の発展が期待されている。

[4] 成果資料

発表論文

- (1) Katow, H., Yoshida, H., Katow, T., Kiyomoto, M. (2018) Ontogeny of a synaptophysin-mediated GABA transmission mechanism from the ciliary band-associated strand to the ciliary band during the development of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *PeerJ Preprints* <https://doi.org/10.728/peerj.preprints.26625v1>.
- (2) 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>
- (3) 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>

学会口頭発表論文

- (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. 第89回日本動物学会大会(北海道大学)。
- (2) 加藤秀生, 吉田裕美, 加藤知子, 清本正 (2019) パンフウニの稚ウニ匍匐運動に関する GABA 作動性制御機構の免疫組織化学及び行動解析. 第90回日本動物学会(大阪市立大学)。