

様式 Z - 7

平成27年度科学研究費助成事業 実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 基盤研究(B) (一般) 4. 研究期間 平成26年度～平成28年度
5. 課題番号

2	6	2	9	0	0	0	7
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 Shoot inによる脳の形成とその機能不全による破綻の解明

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
20223216	イナガキ ナオユキ 稲垣 直之	バイオサイエンス研究科	教授

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

本研究では、脳組織形成を細胞が発生する力を基盤として解明することを目指す。組織形成のための細胞の移動や配置換えを担う仕組み、特にそのために力を発生させる分子機構は未だ不明である。そこで、Shootin1ノックアウトマウスを用いて前脳形成におけるShootinの役割を解明する。また、前脳にGFPを発現するゼブラフィッシュのライブイメージングにより、Shootinによる前脳形成機構を力の発生と細胞移動・配置換えの観点から明らかにする。さらに、ヒトの前脳形成におけるShootinの関与とその機能破綻が前脳形成障害を引き起こす可能性を調べる。

Shootin1にはスプライシングバリエーションShootin1aとShootin1bが存在し、Shootin1のノックアウトマウスでは両方の分子がノックアウトされる。そこで、前脳組織形成にこれらの分子がどのように関与するかを明らかとするため、まず、in situ hybridizationと免疫染色法を用いて前脳の形成時期におけるShootin1aとShootin1bの脳内分布を詳細に解析した。また、ShootinのノックアウトマウスではShootin1の発現部位に一致した前脳の組織形成異常が認められた。興味深いことに、Shootin1bは脳以外に肺、肝臓、胃、腸、脾臓、腎臓、皮膚といった抹消組織の上皮にも発現することが明らかとなった。次に、RT-PCRおよびin situ hybridizationによるゼブラフィッシュにおける遺伝子発現解析を行った。その結果、shootin1がゼブラフィッシュ脳に発現をすることが明らかとなった。また、shootin1以外に新たな遺伝子shootin2およびshootin3を見出し脳以外の細胞でもshootin1の発現を確認し、発生時期におけるShootinの分布を詳細に解析した。shootin1、shootin2およびshootin3の変異体ゼブラフィッシュの作成も進行している。

さらに、Shootinがヒトの前脳形成障害の原因遺伝子である可能性を調べるために、前脳形成障害患者のDNAサンプルを用いて、Shootin遺伝子配列の変異を解析した。

10. キーワード

- (1) Shootin (2) 大脳組織形成 (3) ノックアウトマウス (4) ゼブラフィッシュ
 (5) メカノバイオロジー (6) (7) (8)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(1/6)

11. 現在までの進捗状況

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

現時点までに、マウスにおけるShootin1aとShootin1bの脳および抹消組織における発現領域が明らかとなり、さらにゼブラフィッシュで新たな遺伝子shootin2およびshootin3を見出し、ShootinのノックアウトマウスでShootin1の発現部位に一致した前脳の組織形成異常が確認できたため。また、ヒトの前脳形成障害患者のShootin遺伝子配列解析も進んでいる。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

1) まず、マウスを用いて前脳形成における神経細胞の細胞移動をモニターする。具体的には胎生14.5日目のマウスの脳を、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) でラベルして、生後0日目に回収し、その間に移動したラベルされた細胞を解析する。細胞移動の差を野生型およびShootinノックアウトマウスで比較する。また、野生型およびShootinノックアウトマウスの脳から神経細胞を培養し、細胞移動をタイムラプス計測するとともに細胞が生み出す牽引力を細胞牽引力計測法 (Toriyama et al, Curr Biol 2013) で解析する。
2) 次に、前年度に引き続いてCrisper法を用いたShootin1、Shootin2、Shootin3の変異体ゼブラフィッシュ作成を進める。作成したShootinの変異体の表現型を、脳特異的にGFPを発現するトランスジェニック系統との交配を行って詳細に解析する。さらにShootinの変異が確かに異常表現型の原因であることを確認するために、異常表現型の回復実験を行う。ShootinのmRNAをShootin変異体の受精卵に微量注入し、異常表現型が回復するか否かを調べる。
3) さらに、前年度に引き続き、ヒト全前脳胞症患者のDNAサンプルを用いて、Shootin遺伝子配列の変異を解析する。

以上のゼブラフィッシュ、マウス、ヒトを用いた一連の研究を通じて、Shootinがいかにして脳組織の形成を担うのかを、分子の動態・力の発生・細胞移動・配置換え・組織形成・組織形成の破綻という分子レベルからマクロに至る複数の階層に渡って統合的に理解することを目指す。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

今年度、予想通りの研究成果を挙げたが、予定していた物品が研究室で保存していたものを利用できたため次年度に繰り越した。

(使用計画)

研究の成果を更に高めるため物品の購入に充てるとともに、予定している論文の投稿及び印刷費に充てる。

(課題番号: 26290007)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(2 / 6)

13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(2)件/うち査読付論文 計(2)件/うち国際共著論文 計(0)件/うちオープンアクセス 計(1)件

著者名		論文標題				
K. Tahara, M. Tsukui, T. Maeno, N. Inagaki, *J. Kikuchi		"Efficient Solid-Phase Gene Delivery Mediated by Cerasome: Effect of Reverse Procedure on Transfection Performances in Comparison with Solution-Based Method"				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Chem. Lett.	有	Vol. 44 No. 12	2 0 1 5	p.1643-1645	-	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
http://doi.org/10.1246/cl.150777						
オープンアクセス						
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難						

著者名		論文標題				
勝野弘子, *稲垣直之		神経細胞極性				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
脳科学辞典	有	林康紀 他編	2 0 1 5	-	-	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
10.14931/bsd.7001						
オープンアクセス						
オープンアクセスとしている(また、その予定である)						

(学会発表) 計(5)件/うち招待講演 計(3)件/うち国際学会 計(1)件

発表者名		発表標題	
東口 泰奈, 伊波 幸紀, 勝田 和夫, 米村 重信, 稲垣 直之		上皮における新規タンパク質 shootin1b の機能解析	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第67回日本細胞生物学会	2015年06月30日 ~ 2015年07月02日	タワーホール船堀(東京都江戸川区)	

発表者名	発表標題	
Takuro, Kono., Hitomi, Nakazawa., Colleen, F Manning., James, S Trimmer., Kenji, Kono., Akihiro, Urasaki., Naoyuki, Inagaki.	In vivo function of singar which regulates polarity of cultured hippocampal neurons	
学会等名	発表年月日	発表場所
第38回日本神経科学学会大会	2015年07月28日 ~ 2015年07月31日	神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

発表者名	発表標題	
Naoyuki, Inagaki	Molecular Mechanism for Axon Outgrowth and Neuronal Network Formation	
学会等名	発表年月日	発表場所
7th Annual National Convention of Philippine Society for Developmental Biology (招待講演) (国際学会)	2015年10月24日	UP Diliman(マニラ フィリピン)

発表者名	発表標題	
稲垣 直之	軸索伸長・ガイダンスのメカニクス	
学会等名	発表年月日	発表場所
第6回神経科学と構造生物学の融合研究会(招待講演)	2015年11月26日	岡崎統合バイオサイエンスセンター(愛知県岡崎市)

発表者名	発表標題	
稲垣 直之	Molecular mechanics for axon outgrowth and navigation	
学会等名	発表年月日	発表場所
The Rri-lateral NAIST-TLL-CU Joint Symposium 2016(招待講演)	2016年03月28日	奈良先端科学技術大学院大学(奈良県生駒市)

(図書) 計(0)件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

(出願) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

(取得) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16.本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1)国際共同研究: 国際共同研究である

共同研究相手国	相手方研究機関			
U.S.A	University of California, Davis	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	/	/	/	/

17.備考

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 神経システム生物学研究室 ホームページ
http://nippon.naist.jp/inagaki_g/