

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 26 年 4 月 15 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 慶應義塾大学医学部生理学教室
職 名 特任講師
研究代表者 川内 健史
勤務先所在地 〒160-8582
東京都新宿区信濃町 35
電 話 番 号 03-5363-3749
ファックス番号 03-3359-0437
E - メ - ル takeshi-kawauchi@umin.ac.jp

下記により共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 13014)

1. 共同研究課題名	LDL の取り込みに関連する遺伝子群の大脳皮質における機能解析				
2. 共同研究目的	RME 遺伝子ホモログの脳特異的ノックアウトマウスの解析を行い、大脳皮質形成、動物個体の内分泌代謝への影響を解析する。				
3. 共同研究期間	平成 25 年 4 月 1 日 ~ 平成 26 年 3 月 31 日				
4. 共同研究組織					
氏 名	年齢	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 川内 健史	39	慶應義塾大学 医学部	特任講師	脳における RME 遺伝子群の機能解析	
(分担研究者)					
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	細胞構造分野		氏 名	佐藤 健

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

リポタンパク質は代謝・内分泌において重要な役割を果たすと考えられているが、リポタンパク質の動態制御の生理的意義は未解明な点が多い。そこで、線虫 *C. elegans* において低密度リポタンパク質(LDL)様成分の取り込みに関与するとして単離された RME 遺伝子群に着目し、これらのマウスホモログが脳の形成と機能に果たす役割を個体レベルで調べる。具体的には、脳特異的なノックアウトもしくは簡便に個体への遺伝子導入を行える子宮内エレクトロポレーション法を用いた *In vivo* ノックダウンにより、RME 遺伝子ホモログおよびその関連因子を個体レベルで機能抑制し、LDL 等の物質のエンドサイトーシス関連因子の欠損が脳の形成や動物個体の代謝内分泌にどのような影響を及ぼすかについて検討する。

1) RME 遺伝子群およびその関連因子の機能抑制による大脳皮質形成への影響の解析

リポタンパク質受容体は大脳皮質の層構造形成に深く関与することから、RME 遺伝子群の欠失が、発生期大脳皮質における神経前駆細胞の増殖・分化、神経細胞の移動・成熟といった、一連の層構造形成過程にどのような影響を与えるか調べる。

2) RME 遺伝子群の脳特異的ノックアウトマウスの作出と表現型解析

RME 遺伝子群の機能を個体レベルで理解するために、RME 遺伝子群のホモログを欠失したマウスを作出する。得られたノックアウトマウスを用いて、RME 遺伝子群の欠失が、脳形成にどのような影響を与えるのか、さらに、脳に制御されている代謝・内分泌がどのように変化するのかについて、個体レベルの解析を行う。

7. 共同研究の成果

群馬大学生体調節研究所の佐藤らによって、RME 遺伝子群のひとつである RME6 は、低分子量 G タンパク質 Rab5 の活性化を介して、クラスリン依存性のエンドサイトーシスを制御することが、線虫で示されている(Sato et al. 2005, Nature Cell Biol)。そこで、平成 25 年度の共同研究では、RME 遺伝子群の脳特異的ノックアウトマウスの作出(項目 2)と並行して、*In vivo* ノックダウンを用いた Rab5 の機能解析を行った(項目 1)。

大脳皮質形成において、脳室近辺で誕生した神経細胞は、脳表層までの長い距離を移動する。この移動は多段階であることが知られている。このうち最も移動距離の長い移動様式は、「ロコモーション移動」と呼ばれ、先導突起をもった双極性の神経細胞が、後方に軸索を伸長しながら移動する。これまでの我々の研究により、Rab5 の機能を個体レベルで抑制すると、先導突起は正常に形成されるが、表層への移動ができないことから、ロコモーション移動が異常となることが示唆されている(Kawauchi et al. Neuron, 2010)。しかし、Rab5 を機能抑制した神経細胞は、ロコモーション移動へと変換する以前にも形態異常を示すことから、ロコモーション移動の異常が、移動の初期段階に起きる形態異常の2次的な影響である可能性を否定できなかった。我々は、ロコモーション移動を直接解析するために、大脳皮質のスライス組織培養を用いた新規の阻害剤実験法(*ex vivo* chemical inhibitor assay)を確立してきたことから(Nishimura et al. J Biol Chem, 2010)、これを用いて、ロコモーション移動細胞においてエンドサイトーシスを阻害したところ、移動速度が有意に低下することが分かった。さらに、Rab5 をノックダウンしたロコモーション細胞の移動を、大脳皮質のスライス組織培養を用いて詳細に解析したところ、移動速度が低下するとともに、ロコモーション移動に必要と考えられている核の形態変化(伸長と球状化のサイクル)にも異常がみられることが分かった。以上の結果より、RME6 の下流分子である Rab5 がロコモーション移動を直接的に制御していることが示唆された。一方、RME 遺伝子についての脳特異的ノックアウトマウスの作製を完了し、大脳皮質形成における表現型解析を開始した。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)