

neurons in the nucleus of the tractus solitaries. 第 38 回日本神経科学大会. 神戸, 7 月.

- 2) Negishi Y, Kawai Y. (一般演題 (ポスター): 神経系 3) Morphological features among axon varicosities from different origins in the caudal nucleus of the tractus solitaries. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 福島, 3 月.

解剖学講座

組織・発生

教授: 岡部 正隆	解剖学・発生学
教授: 橋本 尚詞	形態学・細胞生物学
講師: 鈴木 英明	先天異常
講師: 重谷 安代	神経発生学・進化発生学

教育・研究概要

I. 先天性運動失調マウスの解析

先天性運動失調マウスでは筋の固有知覚を伝えている知覚神経に変性像が見られることが分かっているが、脊髄前角の運動ニューロンは詳細に調べられていなかった。そこで、本年は脊髄前角の運動ニューロンの異常の有無を検討した。脊髄前角運動ニューロンは数が多いとは言えず、通常の $3 \sim 5 \mu\text{m}$ のパラフィンあるいは樹脂切片では数個しか認められず、詳細に検討するには数十枚の連続切片を作製して観察する必要がある。そこで、厚切り切片を作製し、Cresyl Violet で染色して蛍光を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM) で観察することにした。切片の厚さは $150 \mu\text{m}$ までは均等に染色され、LSM で全厚の蛍光を捉えることができたが、 $200 \mu\text{m}$ になると中心部は染色が弱く、蛍光が十分に検出できなくなった。そこで切片の厚さを $150 \mu\text{m}$ とし、4 週, 10 週, 20 週の発症個体と見かけ正常個体の L4~L5 の脊髄分節を取り出し、 $150 \mu\text{m}$ の連続切片を 10~12 枚作製し、蛍光染色して脊髄前角の運動ニューロン全体を観察した。その結果、運動ニューロンの数に大きな変化は見られず、変性像も観察できなかったことから、脊髄前角の運動ニューロンには変化は生じていないことが明らかになった。

II. 日本人型 Mosaic Variegated Aneuploidy 症候群 (MVA) の遺伝子解析

MVA はまれな劣性遺伝性疾患で、体細胞の染色体数が不安定になり小頭症や成長障害等の症状を示す。日本人症例の表現型は特徴的で海外症例とは異なる。これまで海外症例で *BUB1B*, *CEP57* が責任遺伝子として同定されているが、日本人症例では全例、片アレルに *BUB1B* のコード領域に変異を認め、もう一方のアレルの変異は *BUB1B* 転写開始点から 44kb 上流にある非コード領域の SNV による hypomorphic 変異が報告されている。しかし、*BUB1B* hypomorphic 変異や *BUB1B* と協調して働く *BUB3* の hypomorphic 変異のマウス疾患モデル

では日本人症例に特徴的な Wilms 腫瘍、非常に強い脳皮質低形成、Danady-Walker 奇形などの症状が現れていない。

昨年度、両親のインフォームドコンセントを得て全エクソンのトリオ解析を施行した。その結果、中心体、線毛、細胞極性に関与する3つの疾患関連変異候補が得られた。本年度はこのうち、変異を導入した *PARD3* (細胞極性タンパク)、*CEP164* (中心体タンパク) を 293 細胞を過剰発現させ表現型を開発した。その結果、患者細胞の表現型から予想された中心体の複製異常や細胞極性異常、Plk1 局在異常は認められなかった。

現在、残る 15 番染色体長腕の BUB1B 近傍にある日本人特異的 SNV (アレル頻度 2.8%) について機能解析を行っている。

Ⅲ. 原始的条鰭類ポリプテルスの軀幹部の側線感丘は表在型である

条鰭類の根幹に位置するポリプテルス *Polypterus senegalus* は、体表にエナメル質を含むガノイン鱗を持つことから、絶滅した原始的条鰭類や硬骨魚を彷彿とさせる。これら絶滅種の化石記録には、鱗の表面に側線のための孔は存在しない。側線感丘は、器械感覚あるいは電気感覚受容器として頭部や体幹の側部に分布しており、ヒトでは内耳や味蕾と相同であると言われている。現存の硬骨魚の側線は形態的な多様性を極め、一方で四足動物では退化する傾向を示し且つ3回の全ゲノム重複を起こしていることから、原始的条鰭類の特徴を示す現存のポリプテルスの側線形成過程を、組織形態学ならびに分子生物学的に観察した。

最初の側線感丘細胞は、神経胚期に脳神経ブラコードや神経堤細胞集団の一部として *Sfrp1* や *Snail2* などの特異的分子マーカー発現によって確認されており、受精後5日目の幼生において表皮上を尾先へ向かって移動する様子が観察された。やがてそれは表皮下層に明瞭なロゼット状構造を示す感丘原基として認められた。その後、側線感丘内に有毛細胞が形成され、表皮上に開いた小孔から外へ突き出る様子が観察された。一方で感丘より伸長される軸索束は近傍の側線神経へと赴いた。なお小孔から突き出た感丘は、最終的に成体になると表皮内に埋没することは昨年報告した通りである。

従って、ポリプテルス軀幹部の側線感丘は神経胚期から成体に至るまで表皮に存在し、一切管状構造を形成しないことから、表在型であると結論づけた。またこの側線感丘の形成過程は既報で知られるゼブ

ラフィッシュのものと良く似ていることが分かった。

Ⅳ. 発生中横隔膜の部位別トランスクリプトーム解析

先天性横隔膜ヘルニアは横隔膜の形成不全を引き起こす指定難病だが、その発症機序はほとんど明らかではない。横隔膜はそれが形成される位置の周囲の異なった細胞群が集まることにより形成されるが、どのような細胞がどの領域を形成するののかの詳細は実は明らかになっていない。横隔膜発生の理解は先天性横隔膜ヘルニアの発症機序を理解する上で非常に重要であり、そのためどのような細胞群から横隔膜が形成されるかを特定することは必要不可欠である。我々はこの横隔膜発生に関連した様々な解析を行う中で、左右非対称に分布する細胞群の存在を明らかにした。この結果から、先天性横隔膜ヘルニアと左右非対称な細胞分布には何らかの関連性があると考え、今回横隔膜を6つの領域に分けてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、トランスクリプトームの結果でも領域別に発現遺伝子の違いが見られ、また、先天性横隔膜ヘルニアに関連するとされる遺伝子にも左右差が存在することが明らかとなった。この結果から、妊娠中の何らかの因子が胎児に影響を及ぼし、その感受性が高い領域が先天性横隔膜ヘルニアを発症する領域である可能性が考えられた。今後、さらに検証実験を重ね左右非対称発現遺伝子と先天性横隔膜ヘルニアの関連性を明らかにしていきたい。

Ⅴ. ゼブラフィッシュの付属肢(胸鰭)の発生における領域特異的な糖鎖修飾

プロテオグリカンとはコアタンパク質に直鎖の糖が付加された物質であり、細胞外マトリックスとしてシグナル伝達の仲介や組織の機械的保持に働く。プロテオグリカンの1つであるヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)の場合、糖転移(糖付加)反応経路の初期に関わる酵素は *Exostosin (Ext)* 遺伝子群にコードされており、このうち *Extl3* 遺伝子はゼブラフィッシュ胚において全身で遺伝子発現が確認される。我々は *Extl3* 遺伝子の突然変異体では胸鰭の軟骨内化骨形成領域が正常発生をする一方で、膜内化骨形成領域が欠損することを昨年度までに見出した。本年度はゼブラフィッシュ胚の胸ビレ発生における他 *Ext* 遺伝子 (*Ext1b*, *Ext1c*) の影響について、CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associ-

ated proteins) 法による遺伝子ノックアウト解析を行った。*Ext1b* や *Ext1c* の単独ノックアウト実験では正常な胸鰭発生が観察されたが、ダブルノックアウト実験では軟骨内化骨形成領域の矮小化と、膜内化骨形成領域の欠失が認められた。*Ext1b* と *Ext1c* の mRNA の局在について whole mount in situ hybridization 法により解析すると、*Ext1b* は胸鰭全体で、*Ext1c* は膜内化骨形成領域のみに遺伝子発現が観察された。糖転移反応では *Ext13* 酵素による N-アセチルグルコサミン付加ののちに *Ext1* 酵素による糖重合がおこなうことから、胸鰭の膜内化骨形成領域の発生には *Ext13-Ext1* 酵素による糖転移が必要であり、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンなどの他プロテオグリカンで機能補償されない可能性が示唆された。ヒトを含む四肢動物ではこの膜内化骨形成領域は存在せず、代わりに指が形成されるため、現在マウスを用いた *Ext* 遺伝子の機能解析により鰭・四肢の形態差を生みだす発生メカニズムを探索中である。

「点検・評価」

1. 教育について

解剖学講座(組織・発生)の教員は、医学科のコース基礎医科学Ⅰユニット細胞から個体への講義および実習、コース基礎医科学Ⅱの各ユニットの講義、形態系実習(解剖学実習および組織学実習)、コース臨床基礎医科学Ⅰのユニット症候学演習およびユニット研究室配属、コース外国語Ⅲユニット医学英語専門論文抄読を担当した。さらに看護学科においては、看護専門基礎科目解剖生理学Ⅰの講義と見学解剖実習を担当した。また慈恵看護専門学校においても人体の構造の講義と見学解剖実習の講義を担当した。

2. 研究について

解剖学講座(組織・発生)の教員は、各自独自の研究テーマを持ち研究を実施している。毎週開催される研究報告会にて研究の進捗状況を報告し、研究内容の客観的評価を受け、これを参考にして研究を進めていく。今年度は英文原著論文4報を発表した。今後も、原著論文および国内外の学会で研究成果を発表し、学内外から当教室における研究に参加する研究者・大学院生を募り、研究を活性化していきたい。

3. その他

今年も Tokyo Vertebrate Morphology Meeting が8月11日(火)に本学南講堂で終日開催された。この研究会は本学の学外共同研究費の助成を受けて

毎年開催しており、今年で5回目となる。脊椎動物の解剖学、発生学、進化学、ゲノム科学、古生物学の各分野の研究者間における研究交流を図るもので、今年は約60名の研究者が集い、丸一日のシンポジウムとポスター発表、交流会を行った。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Moriyama Y¹⁾, Ito F²⁾³⁾ (²Natl Inst Genetics, ³SOKENDAI), Takeda H¹⁾, Yano T, Okabe M, Kuraku S (RIKEN), Keeley FW (Univ Toronto), Koshiba-Takeuchi K¹⁾ (¹Univ Tokyo). Evolution of the fish heart by sub/neofunctionalization of an elastin gene. Nat Commun 2016; 7: 10397.
- 2) Saijo H, Tatsumi N, Arihiro S, Kato T, Okabe M, Tajiri H, Hashimoto H. Microangiopathy triggers, and inducible nitric oxide synthase exacerbates dextran sulfate sodium-induced colitis. Lab Invest 2015; 95(7): 728-48.
- 3) Hayashi S¹⁾, Kobayashi T¹⁾, Yano T, Kamiyama N¹⁾, Egawa S¹⁾, Seki R¹⁾²⁾ (²Natl Inst Genetics), Takizawa K¹⁾, Okabe M, Yokoyama H¹⁾³⁾ (³Hiroasaki Univ), Tamura K¹⁾ (¹Tohoku Univ). Evidence for an amphibian sixth digit. Zoological Lett 2015; 1: 17.
- 4) Akiyama M, Yamaoka M, Mikami-Terao Y, Ohyama W, Yokoi K, Arakawa Y, Takita J (Univ Tokyo), Suzuki H, Yamada H. Somatic mosaic mutations of IDH1 and NPM1 associated with cup-like acute myeloid leukemia in a patient with Maffucci syndrome. Int J Hematol 2015; 102(6): 723-8.

II. 総説

- 1) 辰巳徳史, 岡部正隆. 【進化と発生からみた生命科学】呼吸器系の進化. 生体の科学 2015; 66(3): 208-11.

III. 学会発表

- 1) 岡部正隆. (シンポジウム: 会頭企画シンポジウム かたち作りの進化) 脊椎動物の形態進化研究における古代魚ポリプテルスへの期待. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会. 郡山, 3月.
- 2) 辰巳徳史, 岡部正隆. (一般口演: 発生学-29) Wt1 陽性細胞は横隔膜発生において左右非対称に分布する. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会. 郡山, 3月.
- 3) 矢野十織, 田村宏治, 岡部正隆. (ポスター: 発生・再生・幹細胞・組織形成1) HSPG の糖鎖修飾がゼブラフィッシュ骨発生様式の選択に関与する. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会. 郡山, 3月.

- 4) 平崎裕二, 南沢 享, 岡部正隆. (一般口演: 肉眼解剖学 2-1) 三次元心エコーを用いた軟骨魚類心臓の形態解析. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 郡山, 3 月.
- 5) 岡部正隆. (教育講演 1) 脊椎動物の上陸と呼吸器の進化. 第 39 回日本嚥下医学会ならびに学術講演会. 大阪, 2 月.
- 6) Shigetani Y, Yano T, Okabe M. Morphogenesis of the lateral line neuromast in the primitive fish *Polypterus*. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会). 神戸, 12 月.
- 7) 岡部正隆. (ワークショップ: デジタル画像の処理・解析・保存) 色覚の多様性に配慮したバリアフリーなプレゼンテーション. 第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 枚方, 10 月.
- 8) 宇野好宣¹⁾, 西田千鶴子 (北海道大), 豊田 敦²⁾, 藤山秋佐夫²⁾ (²国立遺伝学研究所), 岡部正隆, 松田洋一¹⁾ (¹名古屋大). (一般講演: 3D 染色体の構造と動態・ゲノム構造・機能解析・遺伝統計) 古代魚の比較染色体マッピングによる脊椎動物のマクロ染色体の進化過程の解析. 日本遺伝学会第 87 回大会. 仙台, 9 月.
- 9) 辰巳徳史, 岡部正隆. 横隔膜発生における Wt1 陽性細胞の分布解析. 第 5 回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting. 東京, 8 月.
- 10) 平崎裕二, 南沢 享, 岡部正隆. 超音波画像診断法 (心エコー) を用いた軟骨魚類心臓の形態・運動特性解析. 第 5 回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting. 東京, 8 月.

分子生理学講座

教授: 竹森 重 筋生理学・体力医学
准教授: 山口 真紀 筋生理学・体力医学
講師: 山澤徳志子 生理学・薬理学

教育・研究概要

I. 水の相転移からみた骨格筋線維内の水状態

骨格筋線維内には少なくとも状態が異なる 5 つの水があることが核磁気共鳴 (NMR) 法, 核磁気共鳴画像 (MRI) 法を用いた研究で明らかになっている。この水の違いは細胞内の水分子集団とそれを取り巻く構造タンパク質との分子間相互作用による束縛によって形成されることが分かったが, ではこの分子間相互作用が具体的にどのようなものであるかについてはいまだ明らかでない。これは NMR 法と MRI 法が, 水集団アンサンブルの振る舞いをみる方法であり, 同じ振る舞いが様々な分子間相互作用の結果として表れ得ることが, 各水集団の特性を分子間相互作用レベルの知見と直接結びつけることを許さないことによる。この難点を補うために, 示差走査熱量測定法 (DSC 法) を用いて骨格筋細胞内の各水分画の分子間相互作用の強さを推定した。DSC 法は温度変化に伴う比熱変化, つまり氷が水に融けるような相転移の検出に優れており, その温度変化で形成／崩壊する分子間相互作用を熱エネルギーとして検出することができる。

一昨年度, 昨年度の研究により, 骨格筋線維では昇温時に -10°C 以下で融ける氷の融解ピークが少なくとも 2 種類あること, および太いフィラメントの除去により融解熱が変わりうることまではわかっていた。さらに実験を進めて今年度はゲルゾリンタンパクによる細いフィラメントの除去でこれらが変化するかどうかを調べた。

カエル骨格筋をゲルゾリンタンパクにより処理することで細いフィラメントをなくした。SDS-PAGE によりそれぞれのタンパク質を定量したところ, アクチン／ミオシンの割合として未処理のものに比べて 3 割程度まで減少した。DSC でみた -10°C 以下の 2 つの融解ピークのうち, 高温側は細いフィラメントを除去することで減少したのに対して, 低温側は細いフィラメントを除去することで増加した。また, 平均比熱として -80°C から $+20^{\circ}\text{C}$ まで昇温する際に必要だった熱エネルギーを見積もると太いフィラメントの有無では変化がなかったが, 細いフィラメントを除去することで減少した。つまり,