

平成22年5月19日現在

研究種目：	基盤研究（B）
研究期間：	2007～2009
課題番号：	19390052
研究課題名（和文）	心臓ギャップ結合の構成蛋白に関する比較分子解剖学的研究
研究課題名（英文）	Comparative and molecular anatomical research of GAP junction-related molecules.
研究代表者	
柴田洋三郎（SHIBATA YOSABURO）	
九州大学・大学院医学研究院・教授	
研究者番号：90037482	

研究成果の概要（和文）：心臓の興奮伝達、同調拍動を担うギャップ結合を構成するコネクシンの相同遺伝子であるパネキシン遺伝子群（ZParx1, 2, 3）を二等脊椎動物ゼブラフィッシュから分離し、配列を決定した。その発現の時空間分布を調べたところ ZParx2 は拍動開始期の心臓で発現を開始し、その後自由遊泳期に筋肉の骨格筋、脈拍が強くなる段階の血管にも発現することが解った。ZParx2 は筋組織の機能の成熟過程に関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：GAP junction mediates the excitation propagation and synchronized contraction of the muscle cells in the heart. GAP junction is composed of connexin molecules. Pannexin is the homologue of connexin. We isolated three pannexin family genes from model lower vertebrate, zebrafish and determined the spatio-temporal expression profiles of zebrafish pannexins (ZParxs). ZParx2 is expressed in the heart at beat-initiation stage, in the skeletal muscles at the free-swimming stage, and later, in the vessels at immature fast blood flow stage. These results indicate the role of ZParx2 in functional maturation processes of the muscle, rather than in determination or differentiation processes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：パネキシン 心臓 筋肉 ゼブラフィッシュ コネクシン ギャップ結合

1. 研究開始当初の背景

Connexin45 (Cx45) は哺乳類で最も早い段階で心臓に発現する GAP 結合構成蛋白質である。我々のノックアウトマウスを用いた解析では Cx45^{-/-}マウスは心内膜床欠損の表現形

を示し、伝導障害により胚性致死であるが、心筋の協調拍動の開始は起こる。Cx43 とのダブルノックアウトマウス (Cx45^{-/-}, Cx43^{-/-}) も同様の表現形である。これらの結果から、心筋の拍動開始にコネクシン分子群以外の

分子（群）による代償機構が示唆された。

2. 研究の目的

下等動物心筋でのギャップ結合構成蛋白の再検討をする。即ち前述のコネキシンが形成するギャップ結合の代償機構を担う分子として、コネキシン相同遺伝子であるパネキシンをその候補と考え、従来と異なる観点からモデル実験生物のゼブラフィッシュを用いることにより、下等動物の心臓ギャップ結合を構成蛋白分子レベルで分子解剖学的に比較解析することを目的とする。

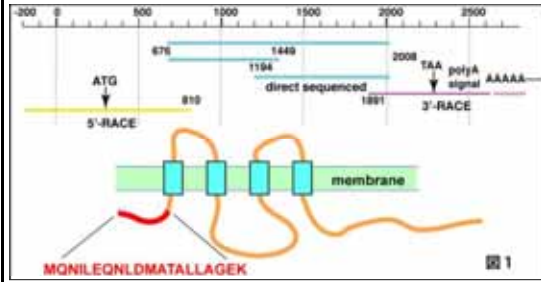
3. 研究の方法

遺伝子データベース（Genbank 等）の情報をもとに、ゼブラフィッシュのパネキシン遺伝子群（ZPanx1, 2, 3）の部分配列と他生物のパネキシンとの配列比較から ZPanx1, 2, 3 配列を予想し、これをもとに遺伝子増幅用の primer を合成した。ゼブラフィッシュの受精後 36 時間後（36hpf）の胚から RNA を抽出して上記の primer を用いた RT-PCR を行って 3 種類のパネキシン遺伝子の cDNA を増幅した。翻訳領域（CRF）の遺伝子配列を決定し、その配列内にさらに primer を合成して翻訳領域外（5' と 3' 側）の配列を smart-RACE 法により決定した。得られた配列より各蛋白質の N 端側のアミノ酸配列に対する抗血清を作成、抗原ペプチドを用いて抗体を精製した。精製抗体を用いて発生各ステージの胚を抗体染色してパネキシンの発現の時空間分布を調べた。

4. 研究成果

（1）RT-PCR と RACE 法により遺伝子配列を決めた結果、ミスマッチを含む配列情報のため ZPanx1, 3 で CRF を決定するに足る配列情報を、また ZPanx2 については 5'、3' 非翻訳領域を含む mRNA 全長の配列を決定した。（図 1 上）その結果、アミノ酸の変更を伴う変異は少ないが存在し silent な一塩基多型も多く、また 2 倍体の染色体間での不一致も見られた。得られた ZPanx2 のアミノ酸配列は最も信頼性の高かった登録配列（XM 681316）よりも C 端側が 8aa 短く（スプライシングにより除かれる）、全長 651aa（分子量 73.1kDa）である。種間配列比較より登録されていた哺乳類（特にヒト）パネキシン遺伝子群の内、遺伝子配列が複数の誤りを含むものがあることが判明した。（現在は修正再登録されている）

（2）疎水性プロットより ZPanx 蛋白質群の構造は、当初の予想通りコネキシンに似た 4 回膜貫通型であるが、いずれも第 2 細胞質ループと C 端側がコネキシンに比べると長い。（図 1 下）



これら基本的構造の特徴は哺乳類のコネキシン分子群とパネキシン分子群の関係によく似ている。また前半領域の 4 回膜貫通領域は種を超えてよく保存されており、C 末端側の細胞質領域は比較的疎水性が高いことが判明した。一方、C 末端領域後半においてラット、マウス、ヒトの配列と著しく相同性が低下する。

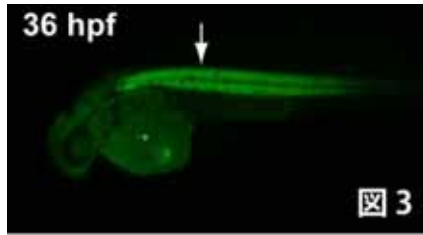
（3）上記の正確な配列確認により N 端側配列（図 1、赤部分）に体する抗体の作製が可能になり、それを用いた whole mount の抗体染色により発生期の発現が明らかになった。その結果、

- ① 心臓の拍動開始時（24hpf）には ZPanx1/3 は胚全体に非常に弱い発現しか認められないのに対し ZPanx2 は心臓に極めて強く発現していること（図 2）がわかった。また発生胚の心臓器官形成開始時期（12hpf）ではほとんど発現していない。

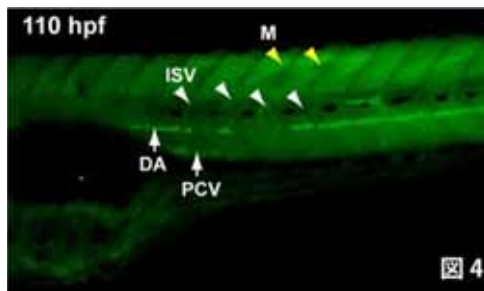


これは既に同定された心臓の分化や機能発現に関与する遺伝子群（特に転写因子群、BMP2, Nrx2.5, CAT4, FGF8 等）が早いもので分裂開始時期（0.75hpf）、遅いものでも体節形成時（10hpf）から発現していることと好対照である。これは ZPanx2 が形成された心臓の機能発現（拍動の開始や協調拍動の確立）に関与することを示唆し、我々の当初の研究目的に大変よく合致することが判明した。配列の高い相同性から、哺乳類においても Panx2 が心臓で何らかの機能を果たしていることが予想される。

- ② Panx2 は卵殻内でくねり運動を始める 36hpf 以降の体側の筋節（骨格筋）で発現し始め（図 3 矢印、図 4 M、孵化し遊泳を始める 48hpf 以降では非常に強くなることや、



③ 自由遊泳期 110hpf では血管、特に背側大動脈 (図 4, DA) や 節間血管 (動脈、図 4 ISV) に強く発現しているが、一方でその発現は血管全長に渡るものではなく破線状に分布していること (図 4, DAISVPCV) がわかった。この時期は血流が速くなり心臓の拍動が強くなるに従って脈管の脈拍も成熟してくる段階に対応する。



これらの結果より ZParx2 は筋組織の発生、分化よりもその機能の開始、成熟過程に関する可能性が示された。

我々は ZParx2 の 5' 側の正確な配列情報を既に得ており、遺伝子発現抑制に使用される morpholino の受精卵への注入により ZParx2 の発現抑制が可能となった。また 24hpf 以前の段階で ZParx2 の発現が検出されないの、心臓機能への効果を直接検出することが可能となった。

ZParx2 は筋収縮の機能開始、成熟にともない発現される新規のチャンネル蛋白質であり、その機能の解析は、心臓の収縮機能形成やその他の筋肉の機能発現、成熟を研究する上で今後の課題としてますます重要になってきた、と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① 柴田洋三郎、ギャップ結合：コネクシン分子の多様な発現：『田原結節』の分子解剖学、Fukuoka Acta Medica 査読有 2010 101(1): 1-9
- ② Kobayashi K Inai T, Shibata Y, Yasui M Dynamic changes in amniotic tight junctions during pregnancy. Placenta. 査読有 2009 Oct; 30(10): 840-7.

- ③ Inai T, Shibata Y Heterogeneous expression of endothelial connexin (Cx) 37, Cx40, and Cx43 in rat large veins. Anat Sci Int. 査読有 2009 Sep; 84(3): 237-45.
- ④ Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y. Freeze-fracture electron microscopic study of tight junction strands in HEK293 cells and MCK II cells expressing claudin-1 mutants in the second extracellular loop. Histochem Cell Biol. 査読有 2009 Jun; 131(6): 681-90.
- ⑤ Kurio H, Mirayana E, Kaneko T, Shibata Y, Inai T, Iida H. Intron retention generates a novel isoform of CEACAM6 that may act as an adhesion molecule in the ectoplasmic specialization structures between spermatids and sertoli cells in rat testis. Biol Reprod. 査読有 2008 Dec; 79(6): 1062-73.
- ⑥ Nishi K, Minamoto S, Minakami R, Miyano Y, Hashizume K, Ohta M, Zhan DY, Lu QW, Shibata Y. Targeted disruption of the cardiac troponin T gene causes sarcomere disassembly and defects in heart beat within the early mouse embryo. Dev Biol. 査読有 2008 Oct 1; 322(1): 65-73.
- ⑦ Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y. Differential expression of the tight junction proteins, claudin-1, claudin-4, occludin, ZO-1, and PAR3, in the ameloblasts of rat upper incisors. Anat Rec 査読有 2008 May; 291(5): 577-85.
- ⑧ Mirayana E, Yanamoto E, Kaneko T, Shibata Y, Inai T, Iida H. Tektin5, a new Tektin family member, is a component of the middle piece of flagella in rat spermatozoa. Mol Reprod Dev. 査読有 2008 Apr; 75(4): 650-8.
- ⑨ 稲井哲一郎, 柴田洋三郎. タイト結合の構造と機能. Fukuoka Acta Medica. 査読有 2008 Feb; 99(2): 25-31.
- ⑩ Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y. Comparative characterization of mouse rectum CM93-I and -II cells by expression of claudin isoforms and tight junction morphology and function. Histochem Cell Biol. 査読有 2008 Feb; 129(2): 223-32.
- ⑪ Sengoku A, Inai T, Shibata Y. Formation of aberrant TJ strands by overexpression of claudin-15 in MCKII cells. Histochem Cell Biol. 査読有

- 2008 Feb; 129(2): 211-22.
- ⑫ Mirayana E, Katoh M, Kanebayashi A, Kaneko T, Shibata Y, Inai T, Iida H Germcell-less like-2 protein is a new component of outer dense fibers in rat sperm flagella. *Reproduction* 査読有 2007 Dec; 134(6): 749-56.
- ⑬ Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y Claudin-7 expressed on lateral membrane of rat epididymal epithelium does not form aberrant tight junction strands. *Anat Rec* 2007 査読有 Nov; 290(11): 1431-8.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 廣瀬英司, 石谷太, 西井清雅, 稲井哲一朗, 柴田洋三郎, ゼブラフィッシュ *Pannexin2* のクローニングと組織発生における発現の解析, 日本解剖学会 第 115 回全国学術集会, 2010. 03. 30. 岩手
- ② 廣瀬英司, 石谷太, 西井清雅, 稲井哲一朗, 柴田洋三郎, ゼブラフィッシュ *Pannexin2* のクローニングと心臓を中心としたその時空間発現解析, 第 8 回コネキシン研究会, 2009. 11. 27. 福岡
- ③ 廣瀬英司, 石谷太, 西井清雅, 稲井哲一朗, 柴田洋三郎, ゼブラフィッシュ *Pannexin2* のクローニングと心臓を中心としたその時空間発現解析, 第 8 回コネキシン研究会, 2009. 11. 27. 福岡
- ④ Hirose E, Ishitani T, Nishi K, Inai T, Shibata Y Molecular cloning of Zebrafish *pannexin2* and the spatio-temporal expression profile in the developing heart. *International Gap Junction Conference*, 2009. 07. 26. USA
- ⑤ 稲井哲一朗, 上村興喜, 廣瀬英司, 柴田洋三郎, タイト結合膜蛋白 *claudin* とタイト結合の形態と機能についての研究, 第 115 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 2010. 03. 30. 岩手
- ⑥ 稲井哲一朗, 仙石昭仁, 廣瀬英司, 柴田洋三郎, タイト結合ストランドの形態と *claudin-1* の細胞外第二ループとの関連, 第 114 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 2009. 03. 28. 岡山
- ⑦ 飯田弘, 栗尾仁之, 稲井哲一朗, 柴田洋三郎, イントロンリテンションにより産出される新規接着分子 *Ceacam6-L* の精巢における発現と局在 (シンポジウム), 第 114 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 2009. 03. 28. 岡山
- ⑧ 稲井哲一朗, 仙石昭仁, 廣瀬英司, 柴田洋三郎, *claudin-1* の細胞外第二ループとタイト結合の形態, 第 7 回コネキシン研究会, 2008. 12. 20. 京都
- ⑨ 稲井哲一朗, 仙石昭仁, 廣瀬英司, 柴田洋三郎, *claudin-1* の細胞外第二ループの変異によるタイト結合の形態の変化, 第 50 回日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会, 2008. 12. 06. 福岡
- ⑩ T Inai, A Sengoku, E Hirose, and Y Shibata Freeze-fracture electron microscopy of tight junction strands formed by expression of *claudin-1* mutants in the second extracellular loop. *9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APM9)*, 2008. 11. 04. 韓国
- ⑪ 稲井哲一朗, 仙石昭仁, 廣瀬英司, 柴田洋三郎, *claudin-1* の細胞外第二ループの変異によるタイト結合の形態と機能の変化, 日本解剖学会 第 64 回九州支部学術集会, 2008. 10. 25. 福岡
- ⑫ 稲井哲一朗, 柴田洋三郎, 血管新生阻害剤による腫瘍血管の退縮過程: 組織学的変化を追う (シンポジウム), 第 113 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 2008. 03. 27. 大分
- ⑬ 稲井哲一朗, 仙石昭仁, 柴田洋三郎, タイト結合蛋白 *claudin* によるタイト結合の形態と細胞間透過性の制御 (シンポジウム), 第 113 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 2008. 03. 28. 大分
- ⑭ 仙石昭仁, 稲井哲一朗, 廣瀬英司, 柴田洋三郎, *claudin-1* の細胞外第二ループの変異によるタイト結合の形態変化の観察, 第 113 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 2008. 03. 大分

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/ana2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 洋三郎 (SHIBATA YOSABURO)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 90037482

(2) 研究分担者

稲井 哲一朗 (TEISUCHIRO INAI)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 00264044
廣瀬 英司 (HIJI HIROSE)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 40380620
飯田 弘 (IIDA HIROSHI)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 70150399