

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590171  
 研究課題名（和文） プロトカドヘリン8サブファミリーの中中枢神経系形成と  
 器官形成における機能的意義  
 研究課題名（英文） Functional Significances of The Protocadherin 8 Subfamily  
 in The CNS And Organ Development  
 研究代表者  
 村上 徹（MURAKAMI TOHRU）  
 群馬大学・大学院医学系研究科・講師  
 研究者番号：10239494

研究成果の概要：研究代表者および共同研究者（以下、我々）は、ゼブラフィッシュのプロトカドヘリン8サブファミリーの遺伝子を複数クローニングし、ゼブラフィッシュ胚発生におけるそれらの発現と機能を明らかにした。プロトカドヘリン（以下、Pcdh）はカドヘリンファミリーファミリーに属する細胞接着分子で、このうちゲノム上にクラスタを成さない非クラスタ型Pcdhについて、その知見は乏しかった。我々は、非クラスタ型Pcdhのうち、Pcdh8サブファミリーが胚発生で果たす役割について研究した。Pcdh18は、中枢神経系や咽頭弓に発現しており、後脳の分節や咽頭弓の形成に関与していると推定された。Pcdh17、19も中枢神経系に発現していた。Pcdh10aは、眼のレンズに発現していた。以上から、これらPcdhが脳や頭部形成に重要だと推測された。また、Pcdh10aの発現がPcdh10bの発現と著しく異なっていたことから、ゼブラフィッシュの系統発生におけるゲノム重複後の機能的分化の一例と考察された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：発生学・形態形成学、細胞接着

## 1. 研究開始当初の背景

差次接着 (differential adhesion)、すなわち、複数種の細胞が混ざっても細胞間接着性の差異によって同種の細胞が集合していく現象は、組織形成の原理の一つである。その分子的裏付けが細胞接着分子であり、カドヘリンスーパーファミリーがとりわけ重要視される。その一つのプロトカドヘリン

(Pcdh) は、無脊椎動物から脊椎動物まで多種存在するファミリーを成す。しかしその機能に関しては具体的知見に乏しかった。

我々は、ゼブラフィッシュ胚におけるPcdh10の体節形成への関与を明らかにし、中枢神経系での発現も示した (Murakami, 他. 2006. Dev Dyn)。Pcdh8、10、18、19などは細胞内ドメインにコンセンサス配列をも

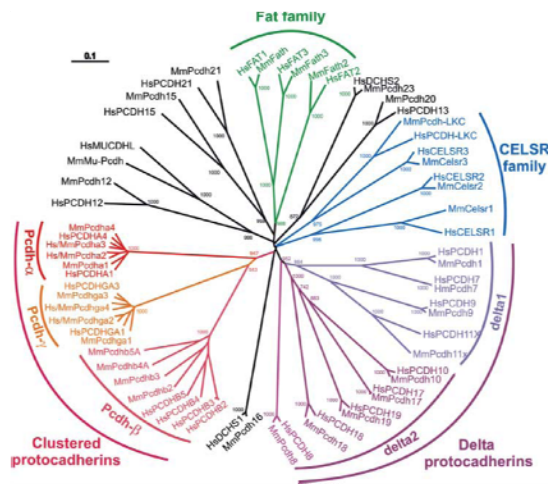


図1 ヒトおよびマウスの Pcdh の系統解析 右下の delta2 が Pcdh8 サブファミリーに相当する。左上のバーは 10 残基ごとのアミノ酸置換を示す。(Redies, et al. Cell. Mol. Life Sci. 2005 より)

つことが知られている。ここではこれを Pcdh8 サブファミリーと呼ぶ(図1)。体節形成には Pcdh8 も関与していることが知られており、サブファミリー内の機能的関連性もわかされた。

Pcdh にはゲノム上に数群のクラスタを構成しているものがあり、神経回路形成などの関連が解析されつつあった。一方、非クラスタ型 Pcdh の機能については、申請者らの Pcdh10 の報告を含む Pcdh8 サブファミリーの文献が少数あるにすぎなかった。非クラスタ型 Pcdh の生物学的意義の理解のためには、それを系統的・網羅的に検索することが必要であり、Pcdh8 サブファミリーについて検索を拡大することがそれに貢献すると考えた。

## 2. 研究の目的

研究目的として、次の2点を設定した：

- (1)ゼブラフィッシュの Pcdh8 サブファミリーの各々について、発現解析やノックダウン解析などにより、中枢神経系形成や器官形成における機能を示すこと
- (2)Pcdh8 サブファミリー細胞内ドメインのコンセンサス配列に結合する未知の分子を求め、細胞質からの調節機構を示すこと

## 3. 研究の方法

研究目的(1)の達成のため、次のような方法を採用した：

クローニング：Pcdh8 サブファミリーの遺伝子のうち、既知のものまたはゲノムから予測されているものについて、PCRによりクローニングする。クローニングされたDNAについて、部分的な配列決定や in situ ハイブリダイゼーション (ISH) により取捨選択する。得られたクローンを元に、コード領域を含む

クローンを得る。全長の配列を決定して既知の配列情報と比較検討する。

発現・機能解析：クローニングした Pcdh8 サブファミリー遺伝子の各々からプローブを合成し、ISHで胚を染色する。各器官系、特に中枢神経系について、発現パターンを詳細に検討する。アンチセンス Morpholino によるノックダウンにより、機能解析をする。

## 4. 研究成果

我々は、Pcdh10a, 17, 18, 19 について、クローニングと発現解析をし、その機能を推定した。また、カドヘリン6の機能も解析した。細胞質からの調節機構については解明に至らなかった。

Pcdh18 は、胚の中中枢神経系、特に菱脳節の境界に沿って特徴的な発現パターンを示し、眼、耳胞、咽頭弓にも発現していた(図2；④、⑨)。Pcdh19 も脳に広く発現し、耳胞や咽頭弓にも発現がみられた。Pcdh17 は、脳や頭部に弱く発現していた(⑨、論文投稿中)。

Pcdh10a は水晶体や耳胞に、発生の比較的限られた期間で発現していた(図3)。しかしノックダウンでは顕著な変化がみられず、相補的な因子の存在が推測された。Pcdh10a と 10b (Murakami, et al. Dev Dyn. 2006) の発現パターンは著しく相違しており、ゲノム重複後の機能的分化の一例と考えられた(⑦、論文準備中)。

カドヘリン6は、糸球体・尿細管原基に発現していた。そのノックダウンにより糸球体・尿細管の形成が阻害された(⑤)。また、カドヘリン6は眼にも発現し、ノックダウンによりその形成が阻害された(②)。これらの研究には、我々の開発した、Morpholino ノックダウンのRNAレスキュー法が役立った。

Pcdh のクローニングは想定外に困難だった。上に記した Pcdh の他にもいくつかのクローンを得たが、詳しい解析には至らなかった。同じ理由で上記のクローンの発現解析や

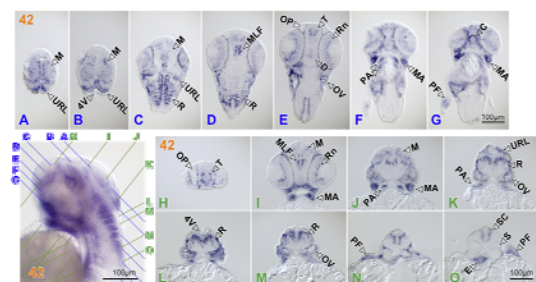


図2 ゼブラフィッシュ胚における Pcdh18 の発現 (青色の染色) 42 時間齢。左下に A-O の切片の向きを示す。4V: 第四脳室、C: 頤、D: 間脳、E: 内胚葉、M: 中脳、MA: 下顎弓、MLF: 内側縦束、OP: 嗅窩、OV: 耳胞、PA: 咽頭弓、PF: 胸鰭、R: 菱脳節、Rn: 網膜、S: 体節、SC: 脊髄、T: 終脳、URL: 上菱脳唇。(④より)

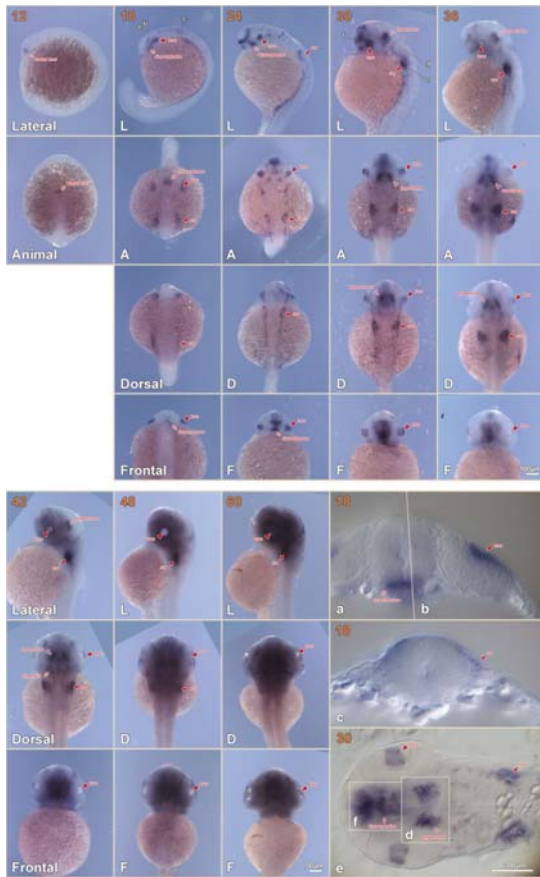


図3 ゼブラフィッシュ胚におけるPcdh10の発現(青色の染色) 赤の数字は受精後の時間を示す。点線はa-fの切片の向き。(⑦より)

機能解析を優先したため、Pcdh8 サブファミリー細胞内ドメインのコンセンサス配列に結合する未知の分子を求めることも計画していたが、実施には至らなかった。本研究計画に続いて我々が企画した研究計画「 $\delta$ -プロトカドヘリンファミリーファミリーの神経発生・器官形成における機能的多様性の意義」(科学研究費補助金基盤計画(C)課題番号21590192)において研究を継続したい。

#### 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6件)

- ①. Tajika et al. (他4名、2番目) VAMP2 is expressed in myogenic cells during rat development. *Dev Dyn* (2008) vol. 237 (7) pp. 1886-92 査読有
- ②. Liu et al. (他8名、6番目) Cadherin-6 function in zebrafish retinal

development. *Dev Neurobiol* (2008) vol. 68 (8) pp. 1107-22 査読有

- ③. Murakami et al. (他2名、1番目) Staging of disease atrophy of skeletal muscles on immunofluorescence microscopy. *Anat Sci Int* (2008) vol. 83 (2) pp. 68-76 査読有
- ④. Kubota et al. (他3名、2番目) Expression of protocadherin 18 in the CNS and pharyngeal arches of zebrafish embryos. *Int J Dev Biol* (2008) vol. 52 (4) pp. 397-405 査読有
- ⑤. Kubota et al. (他3名、2番目) Cadherin-6 is required for zebrafish nephrogenesis during early development. *Int J Dev Biol* (2007) vol. 51 (2) pp. 123-9 査読有
- ⑥. Tajika et al. (他4名、3番目) VAMP2 is expressed in muscle satellite cells and up-regulated during muscle regeneration. *Cell Tissue Res* (2007) vol. 328 (3) pp. 573-81 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 村上 (他3名、1番目) ゼブラフィッシュ胚における $\delta$ -プロトカドヘリンの発現. 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会. 岡山. (2009. 3. 30)
- ② 多鹿 (他3名、3番目) 筋管細胞におけるVAMP2の細胞内局在. 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会. 岡山. (2009. 3. 28)
- ③ 村上 (他4名、1番目) 非クラスタ・プロトカドヘリンのゼブラフィッシュ発生における役割. 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会. 大分. (2008. 3. 28)
- ④ 多鹿 (他3名、3番目) マウス骨格筋組織におけるVAMP5の分布. 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会. 大分. (2008. 3. 27)
- ⑤ 久保田 (他2名、2番目) カドヘリン6はゼブラフィッシュ腎臓の初期形成に重要である. 日本顕微鏡学会第63回学術講演会. 新潟. (2007. 5. 22)
- ⑥ 久保田 (他2名、2番目) 実験はトラブルとの闘い!— はじめてのin situハイブリダイゼーション. 日本顕微鏡学会

第 63 回学術講演会. 新潟. (2007. 5. 22)

[図書] (計 1 件)

- ① 村上. (他 0 名、1 番目) CGで見る筋肉  
図典 筋ナビ・資格試験対策用クイズ付.  
(ソフトウェア) ラウンドフラット (東  
京) (2008. 9)

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 骨格筋検査用キット及び骨格筋検査方  
法

発明者: 村上 徹、依藤 宏

権利者: 群馬大学

種類: 特許

番号: 4150796

取得年月日: 2008 年 7 月 11 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.gunma-u.ac.jp/anatomy/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村上 徹 (MURAKAMI TOHRU)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 10239494

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: