

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590192

研究課題名（和文） $\delta$ -プロトカドヘリン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

研究課題名（英文）Functional significances of the diversity of the delta-protocadherins in the neuro- and organ-developments

研究代表者

村上 徹（MURAKAMI TOHRU）

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10239494

研究成果の概要（和文）：

$\delta$ -プロトカドヘリン (Pcdh) ファミリーの中枢神経系形成と器官形成における機能的多様性の意義を系統的・網羅的に解明することを目的に、ゼブラフィッシュをモデルとして研究を進めてきた。Pcdh9 の発現は、前脳と後脳の腹側の一部の細胞に始まり、脊髄にも発現した。続いて脳の発現が強まる一方、脊髄の発現は消失した。Pcdh17 も Pcdh9 とおよそ同様の領域に発現したが、発現パターンの細部には明確な違いがあった。Pcdh19 の発現は neural keel に始まり、続いて広く脳、眼、耳胞に発現した。Pcdh10a は水晶体や耳胞、脳の一部に極めて特異的に発現した。ノックダウンで眼の形成に障害が現れたが、その発生率は予想外に少なく、相補的な因子の存在が推測された。

研究成果の概要（英文）：

This project was to elucidate the functional significance of the diversity of the deltpa-protocadherins (Pcdh' s) in the development of the CNS and various organs using zebrafish as an experimental model. Pcdh9 started to express in some cells of the forebrain, the ventral hindbrain, and the spinal cord. Its expression in the brain increased over development, while that in the spinal cord decreased. The expression pattern of Pcdh17 was similar to that of Pcdh9, though had distinct differences in detailed patterns. The expression of Pcdh19 started in the neural keel, and expanded to the brain, the eyes, and the otocysts. Pcdh10a specifically expressed in the lens, the otocysts, and certain parts of the brain. Knock-down of Pcdh10a caused deformities of eye structures, though its penetration was relatively low, suggesting unknown complementary adhesion molecules.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：発生学

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まっていく現象は、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ている。

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している (図 1)。Pcdh にはゲノム上に数群のクラスタを構成しているクラスタ型 Pcdh があり、神経回路網形成などとの関連が解明されつつある。一方、クラスタを成さない非クラスタ型 Pcdh についての知見ははまだ孤発的で、その多様性を網羅してはいない。

申請者らは、ゼブラフィッシュ胚における Pcdh10b 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, et al. Dev Dyn. 2006)。体節形成には Pcdh8 も関与していることが知られている。また、Pcdh18 の胚における発現パターンを調べ、脳の分節や咽頭弓の形成に関与しているとした (Kubota, et al. Int. J. Dev. Biol. 2008)。Pcdh10a、17、19 も胚の脳、眼、耳泡にそれぞれ異なるパターンで発現していた (村上, 他. 解剖学雑誌. 2008)。以上から、これらの Pcdh は脳や頭部器官の形態形成に重要だと推測された。一方で、非クラスタ型 Pcdh の多様性の意義の如何を統括的に理解するには、検討の材料はまだ不足である。

非クラスタ型 Pcdh の大半は  $\delta$ -Pcdh ファミリーに属し、上で検索した Pcdh はまさにそ

の一部の  $\delta$ 2-Pcdh サブファミリーを成す。そこで、上の申請者らの結果を踏まえ、さらに精査しながら、 $\delta$ -Pcdh ファミリー全体をより系統的・網羅的に検討・比較することが、 $\delta$ -Pcdh の機能的多様性の生物学的意義の理解に重要と考えられた。

### 2. 研究の目的

$\delta$  (デルタ) プロトカドヘリンファミリーの中枢神経系形成と器官形成における機能的多様性の意義を系統的・網羅的に解明すること。

### 3. 研究の方法

#### 3.1. クローニング

$\delta$ -Pcdh ファミリーの遺伝子のうち、既知のものまたはゼブラフィッシュの全ゲノム配列から予測されているものについて、cDNA ライブラリから PCR により順次クローニングし、配列決定して同定した。

得られたクローンからプローブを合成して in situ ハイブリダイゼーション (ISH) により発現解析した。

#### 3.2. 発現解析

クローニングした  $\delta$ -Pcdh ファミリー遺伝子の各々からプローブを合成し、ISH でゼブラフィッシュ胚を染色した。各器官系、特に中枢神経系について、発生時期ごとに発現パターンを詳細に検討した。

### 3.3. ノックダウン解析

各々の遺伝子のノックダウンのため、配列情報を元にアンチセンスMorpholinoを作成した。それを胚にマイクロインジェクションして表現型を検討した。Morpholinoと合成RNAのコインジェクションによってMorpholinoの作用をレスキューし、ノックダウンの特異性を確認する。一部は、ドミナントネガティブ変異体を作成して、機能をノックダウンした。

### 4. 研究成果

Pcdh9の発現は、前脳と後脳の腹側の一部の細胞に始まり、脊髄にも発現した。続いて脳の発現が強まる一方、脊髄の発現は消失した。Pcdh17もPcdh9とおおよそ同様の領域に発現したが、発現パターンの細部には明確な違いがあった(Liu, et al. Gene Expr Patterns. 2009)。Pcdh19の発現はneural keelに始まり、続いて広く脳、眼、耳胞に発現した(Liu, et al. Int J Dev Biol. 2010)。Pcdh10aは水晶体や耳胞、脳の一部に極めて特異的に発現した。ノックダウンで眼の形成に障害が現れたが、その発生率は予想外に少なく、相補的な因子の存在が推測された(論文準備中)。

### 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3件)

①Bellipanni G, Murakami T, Weinberg ES. Molecular dissection of Otx1 functional domains in the zebrafish embryo. J. Cell. Physiol. 2010; 222(2): 286-293. (査読あり)

②Liu Q, Chen Y, Kubota F, PAN JJ, Murakami T. Expression of protocadherin-19 in the nervous system of the embryonic zebrafish. Int J Dev Biol. 2010; 54(5): 905-911. (査読あり)

③Liu Q, Chen Y, PAN JJ, Murakami T. Expression of protocadherin-9 and

protocadherin-17 in the nervous system of the embryonic zebrafish. Gene Expr Patterns. 2009; 9(7): 490-496. (査読あり)

#### 〔学会発表〕(計3件)

①村上 徹, 小松稔典, 多鹿友喜, 上野仁之, 依藤 宏. ゼブラフィッシュProtocadherin 10aの発現と機能. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会(甲府市). 2012. 3. 26. (ポスター)

②多鹿友喜, 高橋麻衣子, 佐藤真人, 村上 徹, 依藤 宏. 筋衛星細胞の活性化過程におけるVAMP2の発現変化. 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会(盛岡市). 2010. 3. 28. (ポスター)

③高橋麻衣子, 多鹿友喜, 佐藤真人, 村上 徹, 依藤 宏. 筋ジストロフィーマウス骨格筋におけるVAMP5の発現. 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会(盛岡市). 2010. 3. 28. (ポスター)

#### 〔図書〕(計2件)

①村上 徹. 画像処理から発表までのワークフロー. 組織細胞化学 2011. 日本組織細胞化学会(京都). 2011:117-129. (著書. 分担)

②Bogart BI, Ort VH (著), 依藤 宏, 大谷修, 小澤一史, 村上 徹 (訳). 解剖学・発生学(インテグレートッド・シリーズ3). 東京化学同人(東京). 2011. pp. 440. (翻訳. 右)

#### 〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

#### 〔その他〕

ホームページ等 なし

## 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・准教授  
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：