

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590231

研究課題名(和文)非クラスター型プロトカドヘリンの神経形成・器官発生における機能的意義

研究課題名(英文)Functions of the non-clustered protocadherins in the neurogenesis and organogenesis

研究代表者

村上 徹(MURAKAMI, Tohru)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10239494

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文):ゼブラフィッシュの細胞接着因子プロトカドヘリンの一つPcdh10aについて、発現解析と機能解析を行い、水晶体の発生に関与していることが示唆された。そのアイソフォームPcdh10bにはこのような発現や機能はみられない。また他の動物種で同様のはたらきをする細胞接着因子は知られていない。系統発生学的にこれを考察し、硬骨魚類固有の3回目のゲノム重複に由来すると推測された。稚魚から成魚におけるPcdh10aも解析する目的で、それらを可視化できる技術の開発を始めた。

研究成果の概要(英文):The expression and functional analyses of a protocadherin Pcdh10a in zebrafish embryos indicated that it is expressed in the lens primordium and plays a significant role in its development. Comparative evidences is not known in its isoform Pcdh10b, and in other cell-adhesion molecules in other species. This diversity was phylogenetically hypothesized to have been introduced to zebrafish by the third-round whole genome duplication specific to the teleosts. Three-dimensional analysis technology is being developed for further analysis in larva and adult fish.

研究分野：解剖学、発生学、発生生物学

キーワード：発生学・形態形成学 発生生物学 細胞接着因子 プロトカドヘリン ゼブラフィッシュ in situハイブリダイゼーション ドミナントネガティブ変異体 アンチセンスMorpholino

1. 研究開始当初の背景

細胞接着因子カドヘリンは、クラシック・カドヘリン、デスモソーム・カドヘリン、プロトカドヘリンに大別される。プロトカドヘリン (Pcdh) はさらに、ゲノム上の構造によりクラスタ型と非クラスタ型に分けられる。クラスタ型 Pcdh はいずれも脳に発現し、細胞の多様性や神経網の複雑性の分子基盤をなすと考えられている。

一方、非クラスタ型 Pcdh は系統発生的に $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 、 ϵ の3つのファミリーに分けられる (Kim et al. Cell Adh Migr. 2011. 図1)。非クラスタ型 Pcdh の多くは脳や頭部構造に発現して、それらの発生に関与すると考えられている。体節など体幹の構造に発現する場合もある。それらの発現パターンはクラスタ型と比較して極めて多様であり、その複雑性の意義には解明の余地が多い。

非クラスタ型 Pcdh には、その変異が疾患を引き起こすと推定されるものがある。喘息、アルツハイマー病、前立腺癌、統合失調症、癲癇、知的障害、ハンチントン病、網膜ジストロフィーなどとの関連が知られている。反対に腫瘍抑制因子として働く例もある。これらの分子基盤の解明が医療に貢献することも期待される。

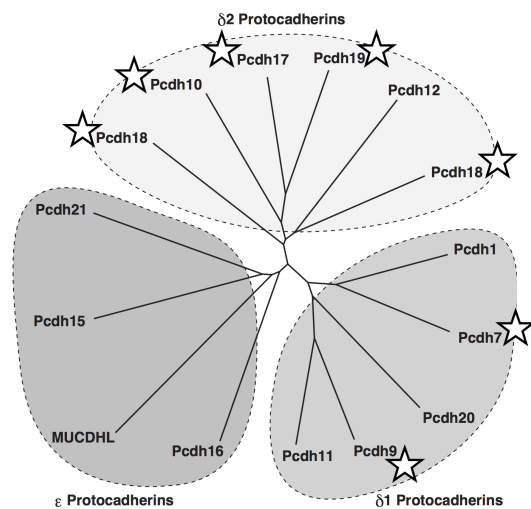


図1 非クラスタ型プロトカドヘリンの系統樹。☆は申請者による研究成果のあったもの

2. 研究の目的

この研究計画の目的は非クラスタ型 Pcdh が脊椎動物の中枢神経系および頭部構造の発生にどう関わっているかを解明することである。特に、それらの多様性が形態形成に関わる意義に注目する。ゼブラフィッシュをモデルに、発現パターン解析、強制発現、ノックダウン解析などを使って解析する。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュの非クラスタ型 Pcdh の cDNA からアンチセンス RNA プローブを作成する。それを使ってゼブラフィッシュ胚を in situ ハイブリダイゼーション法により染色

し、当該遺伝子の発現パターンを解析する。

非クラスタ型 Pcdh のドミナントネガティブ変異体を作成するため、cDNA から細胞内ドメインに相当する部分を欠損させる。これから RNA を in vitro 合成し、胚にマイクロインジェクションして当該非クラスタ型 Pcdh の機能阻害を生じさせる。また、cDNA 配列からアンチセンス Morpholino を設計、合成する。これを胚にマイクロインジェクションして、当該遺伝子をノックダウンする。これらの胚の表現型を調べる。

4. 研究成果

ゼブラフィッシュからクローニングし配列決定した Pcdh10a について、in situ ハイブリダイゼーションによる発現解析と、ドミナントネガティブ変異体やアンチセンス Morpholino による機能解析を行い、Pcdh10a が水晶体の発現に関わっていることが示された。

Pcdh10a の発現は、12 hpf に頭側端と体幹外腹側に始まった。18hpf には眼原基、終脳、間脳、視蓋、脊髄背側の近傍に、24~30hpf には水晶体、耳胞、終脳、間脳、中脳被蓋、視蓋尾側に発現した。水晶体での発現は36hpf を過ぎて減衰したが、耳胞では36hpf に最大となり42hpf を過ぎて減衰した。48hpf には脳に広くび漫性に発現し、以降減衰した (図2)。

眼での発現を詳しく見ると、18hpf に体表外胚葉の水晶体領域に pcdh10a の発現が始まり、24hpf には最大となった。36hpf 以降、水晶体の成熟とともに発現は減少し、42hpf には消失した。42hpf からは網膜と網膜色素上皮に発現し、48hpf から減衰し、72hpf には消失した。耳胞では、18hpf に耳胞上皮で pcdh10a の発現が始まり、72hpf まで続いた。42hpf からは膨大部稜に発現が強まった。24hpf から終脳と間脳に発現が現れ、42hpf にはび漫的になった。中脳被蓋には24hpf から発現が見られ、36hpf に最大となり、42hpf でも続いていた。

Pcdh10a の細胞内ドメインを欠くドミナントネガティブ変異体を作成して胚に強制発現させた。すると眼の形成異常が有意に多く見られた。アンチセンス Morpholino を胚にマイクロインジェクションし Pcdh10a をノックダウンした場合でも、同様の効果があった。体幹の異常も多く見られたが、発生初期に Pcdh10a が体幹にも発現することを反映するものと考えられた。

このようなレンズにおける発現および機能は、アイソフォームの Pcdh10b にはみられない。また、レンズに発現する接着因子としては、他の動物では N-カドヘリンが知られるだけである。分子系統発生的にこれを考察し、硬骨魚類固有の3回目のゲノム重複由来すると推測されたが、それを示唆するデータは得られていない。

稚魚から成魚における Pcdh10a/b の発現についてはまだほとんど知見を得られておら

ず、Pcdh10a/b の機能分化が孵化後にもみられるのかは不明である。そこで稚魚以降の発現解析のために技術開発を始めた (図3)。

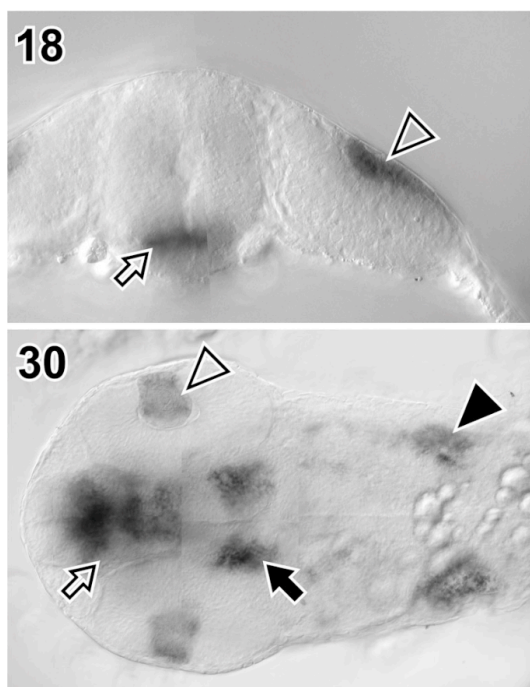


図2 Pcdh10a のゼブラフィッシュ胚における発現。数字は受精後の時間。中抜き三角：水晶体、黒三角：耳胞、中抜き矢印：前脳、黒矢印：間脳

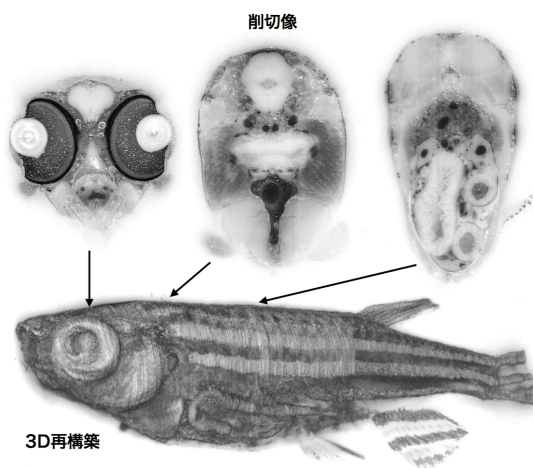


図3 ゼブラフィッシュ成魚の連続断切像と3D再構築像。実際の画像はカラー。3D再構築像は成魚を撮影したものではない。心臓と腸管が一部透けて見える。

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 7 件)

- ① Tajika, Y., Takahashi, M., Ueno, H., Murakami, T., & Yorifuji, H. (2015). Organization of organelles and

VAMP-associated vesicular transport systems in differentiating skeletal muscle cells. *Anatomical Science International*, 90(1), 33–39. DOI: /10.1007/s12565-014-0266-6 (査読あり)

- ② Iriuchishima, T., Yorifuji, H., Aizawa, S., Tajika, Y., Murakami, T., & Fu, F. H. (2014). Evaluation of ACL mid-substance cross-sectional area for reconstructed autograft selection. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy: Official Journal of the ESSKA*, 22(1), 207–213. DOI: /10.1007/s00167-012-2356-0 (査読あり)
- ③ Khairani, A. F., Tajika, Y., Takahashi, M., Ueno, H., Murakami, T., Soenggono, A., & Yorifuji, H. (2014). Filamentous structures in skeletal muscle: anchors for the subsarcolemmal space. *Medical Molecular Morphology*, 48(1), 1–12. DOI: /10.1007/s00795-014-0070-3 (査読あり)
- ④ Murakami, T., Tajika, Y., Ueno, H., & Yorifuji, H. (2014a, January 6). 人体解剖とCTの統合による先駆的医学教育. *Innervation*, 29(1), 2–5. (査読なし)
- ⑤ Murakami, T., Tajika, Y., Ueno, H., Awata, S., Hirasawa, S., Sugimoto, M., et al. (2014b). An integrated teaching method of gross anatomy and computed tomography radiology. *Anat Sci Educ*, 7(6), 438–449. DOI: /10.1002/ase.1430 (査読あり)
- ⑥ Tajika, Y., Takahashi, M., Khairani, A. F., Ueno, H., Murakami, T., & Yorifuji, H. (2014). Vesicular transport system in myotubes: ultrastructural study and signposting with vesicle-associated membrane proteins. *Histochem Cell Biol*, 141(4), 441–454. DOI: /10.1007/s00418-013-1164-z (査読あり)
- ⑦ Iriuchishima, T., Shirakura, K., Yorifuji, H., Aizawa, S., Murakami, T., & Fu, F. H. (2013). ACL footprint size is correlated with the height and area of the lateral wall of femoral intercondylar notch. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy: Official Journal of the ESSKA*, 21(4), 789–796. DOI: /10.1007/s00167-012-2044-0 (査読あり)

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① Murakami, T. (2015/3/23). Anatomy of the lower limbs. Presented at the 120th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists and the 92th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Kobe, Hyogo. (招待講演)
- ② Murakami, T., Tajika, Y., Ueno, H., & Yorifuji, H. (2015/3/23). 3D multi-depth dissection atlas as a complementary resource for anatomy education. Presented at the 120th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists and the 92th Annual

- Meeting of the Physiological Society of Japan, Kobe, Hyogo.
- ③ Takahashi, M., Tajika, Y., Ueno, H., Murakami, T., & Yorifuji, H. (2015/3/21). The expression and localization of VAMP5 protein in the kidney. Presented at *the 120th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists and the 92th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan*, Kobe, Hyogo.
- ④ Tajika, Y., Murakami, T., Takahashi, M., Ueno, H., & Yorifuji, H. (2015/3/21). The 3D-atlas of adult zebrafish. Presented at *the 120th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists and the 92th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan*, Kobe, Hyogo.
- ⑤ Ueno, H., Sato, M., Takahashi, M., Tajika, Y., Murakami, T., & Yorifuji, H. (2015/3/22). Molecular genetics of type IV intermediate filament, synemin. Presented at *the 120th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists and the 92th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan*, Kobe, Hyogo.
- ⑥ Murakami, T., Tajika, Y., Ueno, H., Ozai, D. C., & Yorifuji, H. (2014/3/29). Anatomy in Clay®- 塑像による解剖学英語教育. Presented at *the 118th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, Shimotsuke, Tochigi.*
- ⑦ Tajika, Y., Takahashi, M., Khairani, A. F., Ueno, H., Murakami, T., & Yorifuji, H. (2014/3/28). 筋管細胞に発現する VAMP 分布と発達過程 T 管との比較. Presented at *the 118th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, Shimotsuke, Tochigi.*
- ⑧ Takahashi, M., Tajika, Y., Khairani, A. F., Ueno, H., Murakami, T., & Yorifuji, H. (2014/3/27). 気管支における VAMP5 の発現と分布. Presented at *the 118th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, Shimotsuke, Tochigi.*
- ⑨ Yorifuji, H., Murakami, T., Tajika, Y., Ueno, H., Shikada, M., & Morimura, Y. (2014/3/29). 群馬大学における画像教育の基礎との統合による解剖実習. Presented at *the 118th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, Shimotsuke, Tochigi.* (招待講演)
- ⑩ Tajika, Y., Takahashi, M., Khairani, A. F., Ueno, H., Murakami, T., & Yorifuji, H. (2013/3/21). 骨格筋形成過程における細胞内膜系の電子顕微鏡観察. Presented at *the 118th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, Takamatsu.*
- ⑪ Takahashi, M., Tajika, Y., Khairani, A. F., Ueno, H., Murakami, T., & Yorifuji, H. (2013/3/21). 心筋における VAMP アイソフォームの発現と分布. Presented at *the*

118th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, Takamatsu.

- ⑫ Ueno, H., Sato, M., Takahashi, M., Khairani, A. F., Tajika, Y., Murakami, T., & Yorifuji, H. (2013/3/21). 中間径フィラメント Synemin の分子遺伝学的解析. Presented at *the 118th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, Takamatsu.*

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

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：