

平成 21 年 4 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007~2008

課題番号：19570196

研究課題名（和文） 初期発生における新規膜分子プロトジェニンの役割の解明

研究課題名（英文） A role for a novel membrane protein, Protogenin in early embryogenesis.

研究代表者

渡邊 裕二 (WATANABE YUJI)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：80301042

研究成果の概要：

発生期にはたらく免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)に属する一連の膜タンパク質は、細胞膜上でのタンパク質-タンパク質相互作用を介して細胞内にシグナルを伝え、細胞の形態・接着・分化・移動・生存などの様々な局面での役割を担っている。我々は胚発生期にはたらく新しい IgSF 分子をコードする Protogenin (PRTG) 遺伝子を同定し、原腸陥入運動において、原条から沿軸中胚葉への細胞移動の過程で強く発現することに着目した。抗 PRTG 抗体を作成して細胞内局在を調べたところ、PRTG タンパク質の発現は細胞膜上に限局していた。ニワトリ原腸胚で Protogenin を強制発現して中胚葉細胞の移動を調べると、体節中胚葉の腹側で細胞塊を形成することがわかった。この過程をレーザー共焦点顕微鏡で三次元タイムラプス撮影したところ、これらの細胞の移動速度が正常より低下していた。また PRTG を発現させた培養細胞(L-cell)で aggregation assay をおこなうと細胞塊を形成することから、PRTG は細胞外領域を介して細胞接着に関与すると考えられた。さらに PRTG に対する siRNA を原腸胚で作用させると、Protogenin の発現を阻害された細胞の原腸陥入が阻害されることがわかった。これらの結果から PRTG は原腸陥入運動において細胞接着に必要であり、陥入運動時に細胞群がひと続きになって陥入し、移動していくことに役立っていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生・原腸陥入・中胚葉・細胞接着

1. 研究開始当初の背景

発生期における形態形成には、個々の細胞の自律的な生体反応とともに、細胞間の相互作用による情報伝達が重要である。後者における細胞同士のコミュニケーションには細胞膜上に存在する膜タンパク質が大きな役割を果たしている。我々は胚発生期にはたらく新規遺伝子のスクリーニングの結果、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する新規タンパク質をコードする遺伝子を同定し、**Protogenin**(プロトジェニン)と命名した。その遺伝子産物は細胞外領域にシグナルペプチド、4つの Ig ドメインと5つのフィブロネクチン III 型ドメインをもつ一回膜貫通型の膜タンパク質である。ヒト、マウス、ラット、ニワトリ、ゼブラフィッシュに **protogenin** 遺伝子の存在が確認できたため、脊椎動物に広く保存されていると考えられる。**Protogenin** と相同性の高いタンパク質には3つのサブファミリーが存在し、(1)神経軸索のホモフィリックな接着因子である **L1/NCAM** サブファミリー (2)軸索誘導因子 **Netrin1** の受容体である **DCC/Neogenin** サブファミリー (3)機能のよくわかっていない **Protogenin/Punc/Nope** サブファミリーに分かれる。これらの膜タンパク質は細胞外領域でのタンパク質-タンパク質相互作用を介して接着因子や受容体としてはたらくと考えられている。染色体上での位置を調べると、相同性の高い4つの遺伝子 **Protogenin**, **Punc**, **Nope**, **Neogenin** が同一染色体上の比較的近傍に並んでおり、このようなシンテニーはヒト、マウス、ニワトリの染色体上で保存されていることから、各タンパク質が相似な構造を保ちながらも機能的多様性を有している可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では初期発生における **Protogenin** の役割を解明することを目的とする。とくに **Protogenin** が、発生初期から神経上皮や体節上皮などの未分化な細胞に発現することに注目し、これらの組織での **Protogenin** の機能を解析する。発生中の各組織での

Protogenin 遺伝子のノックダウン (siRNA の導入) や機能阻害 (ドミナントネガティブ体の導入) により、**Protogenin** がどのような生理的機能を担っているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* での強制発現による細胞移動への影響

原腸胚で **Protogenin** を強制発現された細胞の移動を調べる。ニワトリ原腸胚 (発生ステージ 5-6) を濾紙に移し、針電極を用いて陥入前の上胚盤葉に **Protogenin** と GFP の発現ベクターをエレクトロポレーションしたのち、卵白寒天を敷いたガラス底の培養皿に入れる (**EASY culture**)。これを倒立顕微鏡ステージに取り付けられた湿式チャンバー内で培養し (38°C; 5% CO₂)、移動していく GFP 標識細胞の蛍光画像と透過像をレーザー共焦点顕微鏡で三次元タイムラプス撮影して記録する。動画像から細胞の移動方向・移動速度・形態・移動分布を分析する。

(2) *in vivo* での siRNA による発現阻害実験

原腸胚で **Protogenin** の発現を阻害された細胞の移動を調べる。**Protogenin** に対するショートヘアピン型の siRNA コンストラクトを複数作成し、上記1の方法でニワトリ原腸胚に導入する。遺伝子阻害効果の高いコンストラクトについて、細胞の移動の様子を1と同様に記録して分析する。siRNA のターゲット配列に同義置換変異を加えた **protogenin** 遺伝子を共導入して、細胞の動きの変化がレスキューされるかどうか確認する。

4. 研究成果

抗 **PRTG** 抗体を作成して細胞内局在を調べたところ、**PRTG** タンパク質の発現は細胞膜上に限局していた。また原腸陥入前の上皮、陥入中の脱上皮化する細胞、および陥入後の間充織において発現が認められた。ニワトリ原腸胚で **Protogenin** を強制発現して中胚葉細胞の移動を調べると、体節中胚葉の腹側で細胞塊を形成することがわかった。この過程をレーザー共焦点顕微鏡で三次元タイムラ

プス撮影したところ、これらの細胞の移動速度が正常より低下していた。また PRTG を発現させた培養細胞(L-cell)で aggregation assay をおこなうと細胞塊を形成することから、PRTG は細胞外領域を介して細胞接着に関与すると考えられた。さらに PRTG に対する siRNA を原腸胚で作用させると、Protogenin の発現を阻害された細胞の原腸陥入が阻害されることがわかった。これらの結果から PRTG は原腸陥入運動において細胞接着に必要であり、陥入運動時に細胞群がひと続きになって陥入し、移動していくことに役立っていることが示唆された。

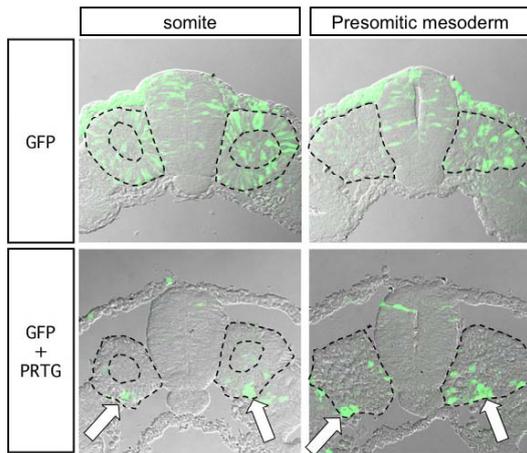


図1 PRTG 強制発現により体節中胚葉の腹側で細胞塊が形成される

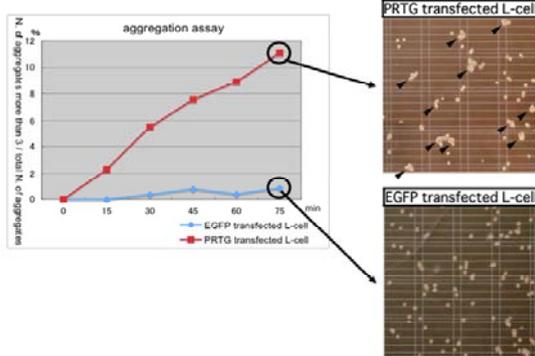


図2 PRTG を発現する L 細胞は細胞接着性が高い

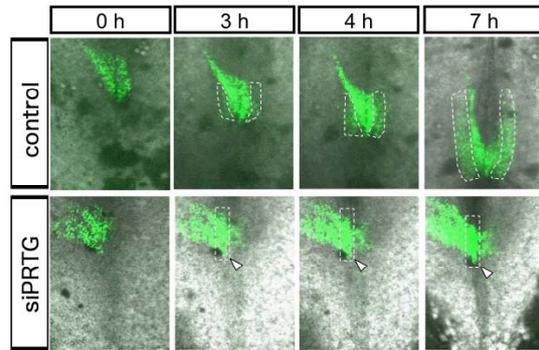


図3 siRNAによるPRTGノックダウンにより原腸陥入が阻害される

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)

[学会発表] (計 4 件)

①伊東宏大、豊田礼子、仲村春和、渡邊裕二
A role for Protogenin(PRTG) during chick gastrulation.

日仏発生生物学会合同年会 平成 20 年 9 月 14 日 フランス・Giens

②伊東宏大、豊田礼子、仲村春和、渡邊裕二
Protogenin(PRTG) regulates gastrulation cell movement mediated by cell adhesion.

第 41 回日本発生生物学会年会 平成 20 年 5 月 28 日 徳島

③伊東宏大、豊田礼子、仲村春和、渡邊裕二
Protogenin(PRTG) is involved in cell movement from epiblast to presomitic mesoderm.

第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会合同大会 平成 19 年 5 月 28 日 福岡

④渡邊裕二、豊田礼子、伊東宏大、仲村春和
Protogenin(PRTG), a novel Ig superfamily molecule associates with Notch signaling in early neural differentiation.

第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会合同大会 平成 19 年 5 月 28 日 福岡

[図書] (計 1 件)

①Kishimoto, K., Watanabe, Y., Springer

Bone formation by BMP gene

transfection.

(Electroporation and Sonoporation in
Developmental Biology) (2009) 263-270.

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 裕二 (WATANABE YUJI)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：80301042