

氏 名	ほり かわ かず き 堀 川 一 樹
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2540 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	体節発生におけるカドヘリン接着機構の研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 竹 市 雅 俊 教 授 永 田 和 宏 教 授 宮 田 隆

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は形態形成過程でのカドヘリン接着機構の解明を目的としており、主に3つの解析から、体節の発生過程におけるカドヘリン接着の役割とカドヘリンの活性調節の重要性を明らかにしている。

申請者はまずカドヘリン接着そのものの必要性を理解するため、カドヘリン遺伝子欠損マウスの表現型解析を行っている。マウス体節ではN-カドヘリンとカドヘリン11が一部重なりを持ちながら発現しているが、これら両方の機能を喪失すると体節の上皮構造が完全に破壊されることを見だし、体節の形成と維持にはカドヘリン接着が必須であることを示している。また、N-カドヘリンの機能だけを無くした場合には体節がその内部で前後に分断されることを見だし、カドヘリン接着は単に細胞を集合させているのではなく、集合性が異なる2つの細胞集団をその強固な接着力でひとまとまりにしていることを明らかにしている。

次に、その致死性ゆえ体節発生後期における表現型解析を行うことができなかった遺伝子欠損マウスにかわり、ニワトリ胚を用いて体節特異的なカドヘリンの機能阻害を行っている。カドヘリン接着をドミナントネガティブに阻害する改変型カドヘリン分子を体節特異的に発現させると、体節上皮だけでなく皮筋節の上皮構造も破壊されることを見だし、カドヘリン接着が体節上皮以外の組織構造の維持にも必須であることを示している。さらに構造が破壊された体節から筋肉や骨が形成されるかについて検討したところ、分化そのものは起こっていたが、筋組織や骨の形態が異常であることを明らかにしている。細胞の移植実験を用いてこうした異常の原因を詳しく調べたところ、カドヘリンの機能阻害が細胞の振る舞いを直接乱したのではなく、移動や再配列といった細胞の振る舞いのための足場構造の破壊が形態形成の異常を引き起こすことを示唆している。

最後に、カドヘリン接着そのものの必要性に加え、活性調節の必要性を検討するため、別のカドヘリン改変分子の効果を検討している。カドヘリンの細胞質領域には接着そのものには必須ではないが活性調節に関わると考えられているJM(juxta-membrane)領域と呼ばれる部分が存在する。JM領域を欠くことで接着の制御を受けないことが期待される変異カドヘリン分子を体節で発現させることで、筋節の形態に接着の阻害時とは全く異なるパターンの乱れが生じることを見だした。筋節の正しい発生には筋細胞の移動や再配列が必須であることから、こうした過程にJM領域を介したカドヘリン接着活性の制御が必要である可能性を示している。さらにJM領域に様々な変異を導入した改変型カドヘリンを用いて、接着制御の分子機構を明らかにしようとしており、正常な筋節発生にはJN領域内の特に保存度が高い部分が重要であること、ここに結合するp120^{cm}は必須でないことを示している。したがってカドヘリンの活性調節にはN領域に結合するp120^{cm}以外の因子が重要な役割をもつことが強く示唆された。

以上の結果から組織構築の過程ではカドヘリン接着が必須だけでなく、その活性調節も重要であると結論している。

論文審査の結果の要旨

既に行われている多くの研究により組織構造の維持にはカドヘリン接着が必須であることが示されているが、新たに構造を作り出す過程でのカドヘリン機能に関する研究は限られていた。本研究では組織の形態がシンプルでかつダイナミックに変化する体節発生に注目し、この過程でのカドヘリン接着そのものおよび活性調節に関する問題の解明を目指している。

申請者は、まず体節発生におけるカドヘリン接着の役割を明らかにするため2つの方法でカドヘリンの機能を阻害しその効果を検討している。

まず、体節に発現する2つの既知のカドヘリンについて、単独および二重変異マウスの表現型解析を行い、カドヘリン機能の段階的な喪失に対応し体節の上皮構造があるパターンをもって破壊されることを見いだしている。このパターンは体節単位内に潜在的に存在していた接着性の違いにより引き起こされたと考えられた。古くから体節内部の細胞はその前後で集合性が異なるのではないかと想像はされていたが、接着性の違いを直接示唆する結果は今回の研究により初めて明らかにされたもので、その意義は大きい。

遺伝子欠損マウスはその致死性ゆえに解析対象となりうる形態形成現象が限られていた。申請者はこの問題を克服するため体節特異的にカドヘリン機能の阻害も行っている。アデノウイルスベクターを利用して機能阻害型のカドヘリン改変分子を体節特異的に発現させた結果、体節上皮およびこれに由来する筋節の形態が乱れることを見いだしている。さらに細胞の移植実験を行うことで、カドヘリン接着が個々の細胞の振る舞いに直接必須ではなく、細胞が正しく振る舞うための足場構造の維持に必要であることを示している。本研究では時間的かつ空間的に制御された方法でカドヘリン機能を阻害することで新しい知見を得ており、このやり方が生体内におけるカドヘリン機能の解析に極めて有効であることを示している。

加えて申請者は、この方法を用いてカドヘリン接着そのものの必要性ではなく、活性調節の重要性を検討するため別のカドヘリン変異分子の効果を検討している。カドヘリン細胞質ドメインに存在する JM 領域は、*in vitro*の研究からカドヘリンの活性調節に関わる可能性が示唆されていた。これまでに JM 領域を欠くことで活性調節を受けないことが期待される変異カドヘリン分子の活性が *in vivo* で検討された例はなかったが、申請者は体節域でこの変異カドヘリン分子の効果を検討し、筋節の形態に接着の阻害時とは全く異なるパターンの乱れが生じることを見いだしている。JM 欠損カドヘリンは *in vitro*での筋細胞の分散を阻害したり、*in vivo*での筋細胞の配置パターンを大きく乱すことから、カドヘリン JM 領域は細胞の移動や再配列に必須であることが明らかになった。さらにカドヘリンの活性調節機構の分子の実態に迫るため *in vivo*での JM 領域のドメイン解析を行い、カドヘリン間で非常に高度に保存されるアミノ酸領域が筋節形成に必須であること、かつこの部分には p120^{cas} 以外の因子が結合しカドヘリンの活性を調節している可能性を示した。これまでにカドヘリン接着の活性調節の研究はほとんど進んでいない。今回行われた研究は *in vivo*でのカドヘリン活性調節の重要性を初めて直接的に示しただけでなく、今後この分野の研究が一気に進むための土台を築きあげた点で十分な評価に値する。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認められる。

なお、主論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について口頭試問を行った結果これを合格と認めた。