

Title	DE-cadherin細胞外領域の構造と機能が果たす形態形成過程における役割
Author(s)	春田, 知洋
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/23473">https://hdl.handle.net/11094/23473</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	はる た とも ひる 春 田 知 洋
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 23584 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	DE-cadherin細胞外領域の構造と機能が果たす形態形成過程における役割
論文審査委員	(主査) 招聘教授 橋本 主税 (副査) 教 授 三木 裕明 招聘准教授 小田 広樹

### 論 文 内 容 の 要 旨

cadherin はアドヘレンスジャンクション(AJ)を構成する接着タンパク質である。cadherin は一回膜貫通型タンパク質であり、細胞外領域はホモフィリックな接着を行ない、細胞質領域は細胞骨格への裏打ちを行なっている。形態形成過程において、cadherin は、様々な細胞運動に必要とされているが、この時 cadherin は、接着だけでなく、いくつかの複合的な機能が求められている。これまでに cadherin 遺伝子は、幅広い動物で同定され、一次構造が明らかにされた結果、cadherin の細胞質領域は保存されているものの、細胞外領域のドメイン構成には、系統を反映した多様性が存在する。この多様性は、棘皮動物や軟骨類でみられる長いタイプの cadherin を祖先的であると仮定すると、進化的に独立な短縮化によって説明される。この進化を反映した cadherin の構造変化が与えた機能的影響は、よく解っていない。

本研究では DE-cadherin の構造と機能の関係を明らかにすることにより、cadherin の細胞外領域の短縮化が与える機能への影響や、短縮化を許容する要因について検証を試みた。DE-cadherin の細胞外領域は、カドリンファミリーを定義する EC ドメインが7回タンデムに存在するのに加え、無脊椎動物の cadherin に保存して見つかる PCCD 複合体と呼ばれるドメイン複合体を細胞膜近傍部に持つ。まず DE-cadherin の接着に必要な領域を明らかにするため、細胞外領域を様々な欠いた欠失分子を作成し、接着活性を測定した。その結果、細胞膜近傍の EC7 と PCCD 複合体(アミノ酸にして細胞外領域全長の47%)を失いながらも、接着活性をもつ欠失分子、Δ734-1316(ΔEAP)を見つけた。この結果は、DE-cadherin の細胞外領域は、接着に必要とされる膜遠方部領域(EC1-EC6)と、接着には必要とされない膜近傍部領域(EC7-PCCD)に分けられることを示す。さらに ΔEAP を用いて、DE-cadherin 変異体である *shotgun* (*shg*)の胚や組織のレスキューを行なうと、上皮形成を始め、多くの形態形成を ΔEAP は達成する。しかし、腹溝形成過程において DE-cadherin を完全に ΔEAP に置き換えた胚では、細胞の頂端部収縮が低下、また収縮を達成した細胞における AJ の接着連絡の破綻が観察された。このことから DE-cadherin 細胞外領域の膜近傍部領域(EC7-PCCD)は、腹溝形成過程における効率的な細胞の頂端部収縮の達成するために、AJ の安定化に寄与していると考えられた。cadherin が腹溝形成のような上皮の折れ曲がりが必要としていることは、これまでも信じられていたが、技術的な困難から状況証拠を集めるに留まっていた。この結果は、上皮の折れ曲がりには cadherin が必要とされていることを遺伝学的に直接、証明している。

また ΔEAP に EC7 を加えた Δ833-1316(ΔPCCD)は、ΔPCCD 同士のホモフィリックな接着が失われているが、正常な DE-cadherin とはヘテロに接着し、個体で発現させると細胞膜に局在する。この ΔPCCD と DE-cadherin とは異なる接着特異性を持つ DN-cadherin によって、*shg* の胚や組織のレスキューを行なった。この結果、気

管の形成や、卵母細胞の位置決定は DN-cadherin で代替できるが、 $\Delta$ PCCD では完全にレスキューできず、これらの組織では接着特異性は関係なく細胞を接着させることが重要であると考えられた。その一方、細胞の遊走や緊密化は、DN-cadherin ではレスキューしないが、 $\Delta$ PCCD によってレスキューし、細胞を接着させるだけでは十分で無かった。また DE-cadherin を完全に  $\Delta$ PCCD に置き換えた胚では、DEAP に置き換えた胚と同様に腹溝形成に異常が観察された。しかし、 $\Delta$ PCCD に置き換えた胚では、頂端部収縮を行なう細胞が間充織状になっており、さらに MyosinII の頂端領域局在が達成されず、DEAP に置き換えた胚の表現型と異なっていた。この結果は、腹溝形成過程において、DE-cadherin は細胞の頂端部収縮における AJ の安定化以外にも機能を持つことを示唆する。

本研究の結果から、形態形成に対する DE-cadherin の役割は、いくつかの機能に分解できることを示す。また人工的に cadherin を短縮化させても、接着活性や、上皮形成に影響を与えないことから、進化の過程の cadherin の短縮化も、一回の大きな変化によって達成できたことを説明する。

## 論文審査の結果の要旨

春田知洋氏の学位論文は、ショウジョウバエの上皮カドヘリン細胞外領域の構造と機能の関係を、遺伝学的手法を駆使して解析したものです。彼の研究は、脊椎動物のカドヘリンと無脊椎動物カドヘリンの構造的違いに着目し、その違いが意味する機能的意義の解明を目指した非常に挑戦的な研究目的であり、類似する研究は他では見当たらないと考えます。

彼の研究の起点となる重要な発見は、細胞外領域の膜近傍側半分を欠くカドヘリンが正常に近い接着活性を培養細胞において示すことを発見した事です。DE  $\Delta$ P と名付けられたこの分子は、遺伝学的なレスキュー実験により、生体内で上皮の形成と維持、その他、多くの形態形成で十分な機能を果たしうる事が春田氏により示されました。DE  $\Delta$ P で欠いた部分には無脊椎動物のカドヘリンに特有の構造がすべて含まれており、無脊椎動物カドヘリンに特異的な領域が上皮の形成や維持に必須ではないことを示すことに見事に成功していると考えられます。彼は、DE  $\Delta$ P が多くのカドヘリン依存的な形態形成で正常なカドヘリン分子と同等の機能を果たせる事を示す一方、予定中胚葉上皮の折れ曲がり運動で DE  $\Delta$ P が十分な機能を果たせない事を示しました。この事に関連して定量的な解析も試みており、カドヘリンの細胞外領域の機能的重要性を示す説得力のあるデータが提示されています。しかし、DE  $\Delta$ P で欠いた部分の構造が正常分子においてどのような機能／役割を持っているかについては、多くの可能性を残しており、はっきりとした結論は得られていません。それでも、本研究は、上皮細胞シートの折れ曲がり運動にカドヘリンの機能が関わる事を示す最初の遺伝学的根拠を提供しており、この点において、本研究の価値は極めて高いと評価できます。

春田氏が解明する事を目指したカドヘリンの構造的違いの機能的意義について、十分なデータが得られたとは言えませんが、動物が上皮を形成する能力を保持したままカドヘリンの構造が一回の変化で大きく変わることを実験的に示した事は動物進化の観点から重要な意味を持っていることは確かです。また、進化的事象を実験的に検証したその先進的な春田氏の取り組みは高く評価できます。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認めます。