マウス神経系における上皮型カドヘリンとα -, β -カテニンの発現と局在

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 村松, 直樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9299

金沢大学十全医学会雑誌　第107巻　第2号　108－117（1998）

マウス神経系における上皮型カドヘリンと α-, β-カテニンの発現と局在

金沢大学医学部医学科脳神経外科学講座（主任：山下純宏教授）
村　松　直　樹

カルシウム依存性接着分子である上皮型カドヘリン (E-カドヘリン) は，中枢神経系の発生過程では一次感覚神経の神経束形成に関与する一方，末梢神経系ではグリア-グリアネットワークの維持に働くなど多彩な機能を持つ．細胞内タンパクであるカテニンが，E-カドヘリンの細胞質領域に結合することにより，E-カドヘリンの接着能を制御するとされる．本研究の目的は，マウス神経系におけるE-カドヘリン，α-，β-カテニンの発現と局在を生化学的・免疫組織化学的に検討し，カドヘリン-カテニン複合体の神経組織の形成・維持に与える機能を考察することである．イムノブロット解析では，三叉神経，坐骨神経，後根，後根神経節に，E-カドヘリン，α E-カテニンともに発現していた．α N-カテニンは大脳，小脳，脳幹，脊髄と後根神経節に発現していた．β-カテニンは検索した全ての神経組織に発現していた．免疫組織化学的には，E-カドヘリンは脊髄ではRexed第Ⅱ層，脊髄後根神経節では後根神経節細胞と衛星細胞に，坐骨神経ではシュワン細胞と髄鞘外側部に発現していた．α E-カテニンは，脊髄では中心管の上衣細胞と一部の神経細胞を含む灰白質に，後根神経節では神経節細胞と衛星細胞，坐骨神経ではシュワン細胞と髄鞘外側部に発現していた．α N-カテニンは後根神経節では神経節細胞と衛星細胞，脊髄では脊髄灰白質全体，とりわけRexed 第Ⅱ層および中心管の上衣細胞に強く発現していた．抗E-カドヘリン抗体を用いた免疫沈降では，三叉神経，後根神経節，坐骨神経において，E-カドヘリンはα E-カテニンと複合体を形成していたが，α N-カテニンとの結合は証明されなかった．以上より，カドヘリン-カテニン複合体が複数の組合せにより複雑に細胞接着にかかわるなかで，三叉神経，後根神経節，坐骨神経では，α E-カテニンがE-カドヘリンと複合体を形成し，軸索束形成と末梢性グリアの接着ならびに細胞内のシグナル伝達を制御するものと思われた．

Key words　α E-catenin, α N-catenin, E-cadherin, immunoprecipitation, nervous system

緒　　言

接着分子は，細胞表面に存在し，細胞接着に関与する．神経細胞とその突起である軸索には，様々な接着分子が発現し，軸索束形成や成長円錐のガイダンスに関与すると考えられている．神経組織における細胞接着分子には，神経細胞接着分子 (neural cell adhesion molecule)，L1を代表とする免疫グロブリンスーパーファミリー[1]，ペイリーレイトアンチゲンに代表されるインテグリンスーパーファミリー[2]，神経型カドヘリン (N-カドヘリン) を代表とするカドヘリンスーパーファミリー[3,4]等が知られている．

カドヘリンは，Takeichiら[5]により同定されたカルシウム依存性に接着し細胞外にカドヘリンドメインを持つ細胞接着タンパク群で，膜貫通型の糖タンパク質である[5~7]．カドヘリンスーパーファミリーのうちカルシウム依存性に接着し，細胞内領域でカテニンと結合するものは，古典型カドヘリンと呼ばれている．このうちⅠ型の上皮(E)型，神経(N)型[8]，網膜(R)型[9]，切断(T)型[10]，脳(B)型[11]のカドヘリンが神経系に存在する．N-カドヘリンは，発生の初期段階ではいたるところに発現しているが，その後，網膜や視機能に関連した部位や，網様体系，辺縁系に限局し，選択的な神経回路網形成に関与していると考えられている[12]．上皮型カドヘリン (E-カドヘリン) は，分子量120 kDa のタンパクで，主に上皮細胞に発現し，その機能は上皮細胞の接着のみならず，消化管上皮における極性の形成，神経上皮の分化発生，癌細胞の浸潤転移の抑制機能も合わせ持つ[13]．E-カドヘリンは，脊髄内ではRexed Ⅱ層に限局して発現し[13,14]，一部の感覚神経の神経束形成に関与する一方で，脊髄後根神経節内では衛星細胞間の接着，衛星細胞と神経節細胞との接着に関与し[14]，さらに正常のシュワン細胞のオートティピックアドヘレンスジャンクションの形成[15]と神経再生時の分裂・増殖した反応性シュワン細胞の接着に関与する[16]．最近PCR法を用いてⅡ型カドヘリン群(カドヘリン5-12) が発見された．聴覚野にカドヘリン6，運動野にカドヘリン8，11，体性感覚野にカドヘリン6，11といったように，マウス大脳の皮質領野に対応して発現していることが判明しつつある[17~20]．

カドヘリンの細胞外領域にはカルシウムの結合する4-5個の

平成9年11月28日受付，平成10年2月25日受理

Abbreviations：BSA, bovine serum albumin ; DRG, dorsal root ganglia ; TBS, Tris-buffered saline

繰り返し構造が存在する[21)22)]．細胞内領域にはカテニン，P120が結合しており，それらを介してカドヘリンは，細胞骨格系とつながっていると考えられている[23)24)]．カドヘリンにβ-カテニンが直接結合し，β-カテニンにα-カテニンが結合している[25)~27)]．さらにα-カテニンがアクチン，α-アクチニンと結合し細胞骨格を形成している[28)29)]．α-カテニンの発現が欠除したE-カドヘリン発現腫瘍細胞にα-カテニンのcDNAを導入し，α-カテニンを強制発現させるとカドヘリンを介した接着能が出現することより，α-カテニンがカドヘリンの接着能を制御していると考えられている[30)~33)]．

α-カテニンには2つのサブタイプ，α E-カテニン[34)35)]とα N-カテニン[32)36)]の存在が明らかになっている．選択的軸索束形成，シナプス形成，さらには神経損傷後の再生時に重要な役割を果たすカドヘリンとこれを制御する細胞内関連タンパクを，神経系の部位，細胞単位で特定することは，神経組織構築の維持，神経再生の機能を探るうえで重要なことと思われる．脊髄後角Rexed Ⅱ層に限局性に発現するE-カドヘリン[14)]は，α N-カテニンと複合体を形成している可能性が示唆されている[37)]が，神経組織におけるカドヘリン-カテニン複合体に関しては不明な点が多い．本研究では，E-カドヘリン，α-，β-カテニンの神経系の各部位における局在とこれらの細胞内結合の有無を検討することを目的とした．

材料および方法

Ⅰ．動物および標本の作製

3から5週令，体重10-15gの雌BALB/cマウス（日本SLC，静岡）を用いた．標本摘出はすべて5％抱水クロラール（0.01ml/g体重）の腹腔内投与による麻酔下にて行った．

Ⅱ．イムノブロット解析

マウスより大脳，小脳，脳幹，三叉神経，脊髄，後根，後根神経節，坐骨神経を採取した．大脳組織は間脳を含まないようにし，脳幹は中脳，橋，延髄を一塊として用いた．三叉神経には，半月神経節を一部含んだものを用いた．脊髄組織は，下位頚髄から全腰髄を一塊として採取し，約5mm間隔に冠状断とした後，中心管とその周辺の灰白質約2分の1を含む脊髄中心部，周辺部約2分の1の灰白質と全白質を含む部分に二分して検索した．採取した組織は，5％2-メルカプトエタノールを含むSDS緩衝液に溶解し超音波破砕器にてホモジナイズした後に，90℃で3分間温浴させた．これらの試料をSDS-PAGEで分離し，ニトロセルロース膜に転写した[38)]．ゲルをクーマシーブリリアントブルー（coomasie brilliant blue）にて染色を行い，タンパク量をほぼ一定にした．この膜を1％仔ウシ血清アルブミン（bovine serum albumin, BSA）にてブロッキングを行い，1次抗体；抗E-カドヘリンラットモノクロナール抗体（ECCD-2, 宝酒造，大津），抗α E-カテニンラットモノクロナール抗体（α-18）[34)]，抗α N-カテニンラットモノクロナール抗体（NCAT-2）[32)39)]，抗β-カテニンウサギ抗体（C-2206, Sigma, Saint Louis, USA），抗アクチンウサギポリクロナール抗体（BT-560, Biomedical Technologies Inc., Stoughton, USA）と反応させた．その後，アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ラットIgG抗体もしくはアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギIgG抗体と反応させた．アルカリホスファターゼ基質キット（Vector Laboratories, Burlingame, USA）を用いて発色反応を行った．

Ⅲ．免疫組織化学

マウスを麻酔後，2mMの塩化カルシウムを含有した0.01M HEPES緩衝液（pH7.4）に4％パラホルムアルデヒドを溶解した固定液40mlを左心室より注入し，潅流固定を行った．直ちに標本を摘出し同固定液により12時間浸透させた後，10，20，30％ショ糖を含有する0.01M HEPES緩衝液（pH7.4）にそれぞれ6時間ずつ浸透させた．その後，標本をTissue-Teck O.C.T. コンパウンド（Miles, Elkhart, USA）に包埋し液体窒素で凍結し，Cryostat（Miles）にて6μmの厚さの切片を作製し，ポリ-L-リジンを塗布したスライドガラスに貼付した．内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止するために，切片を-20℃で20分間3％過酸化水素水を含有したメタノールに浸透させた後，非特異的抗体を阻止するために0.1％正常ウサギ血清を含む2mMの塩化カルシウムを含有した0.05M Tris緩衝液（Tris-buffered saline-Ca, TBS-Ca）と20分間室温で反応させた．1次抗体；ECCD-2，α-18，NCAT-2，C-2206，BT-560と反応させた（α-18は一晩，その他は2時間）．2次抗体としてウサギビオチン化抗ラット抗体

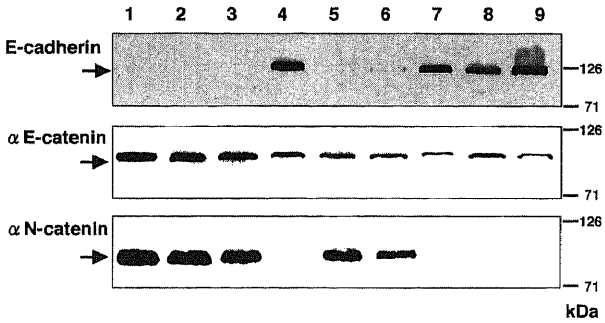

Fig.1. Immunoblot analysis of the mouse cerebral cortex (line 1), cerebellum (line 2), brain stem (line 3), trigeminal nerve (line 4), central portion of spinal cord (line 5), peripheral portion of spinal cord (line 6), dorsal root (line 7), dorsal root ganglion (line 8), and sciatic nerve (line 9) with anti-E-cadherin, anti-α E-catenin, and anti-α N-catenin antibodies, respectively. Molecular weight standards (126 and 71 kDa) are indicated to the right of the blot.

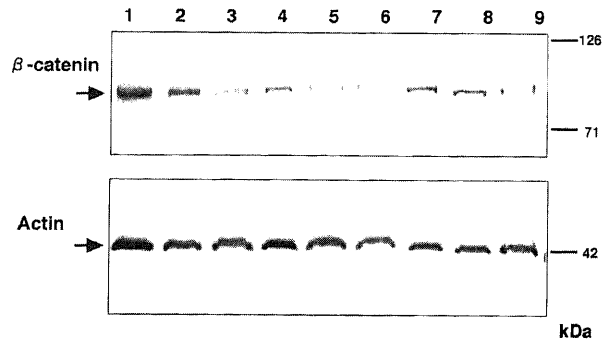

Fig. 2. Immunoblot analysis of the mouse cerebral cortex (line 1), cerebellum (line 2), brain stem (line 3), trigeminal nerve (line 4), central portion of spinal cord (line 5), peripheral portion of spinal cord (line 6), dorsal root (line 7), dorsal root ganglion (line 8), and sciatic nerve (line 9) with anti-β-catenin and anti-actin antibodies, respectively. Molecular weight standards (126, 71, and 42 kDa) are indicated to the right of the blot.

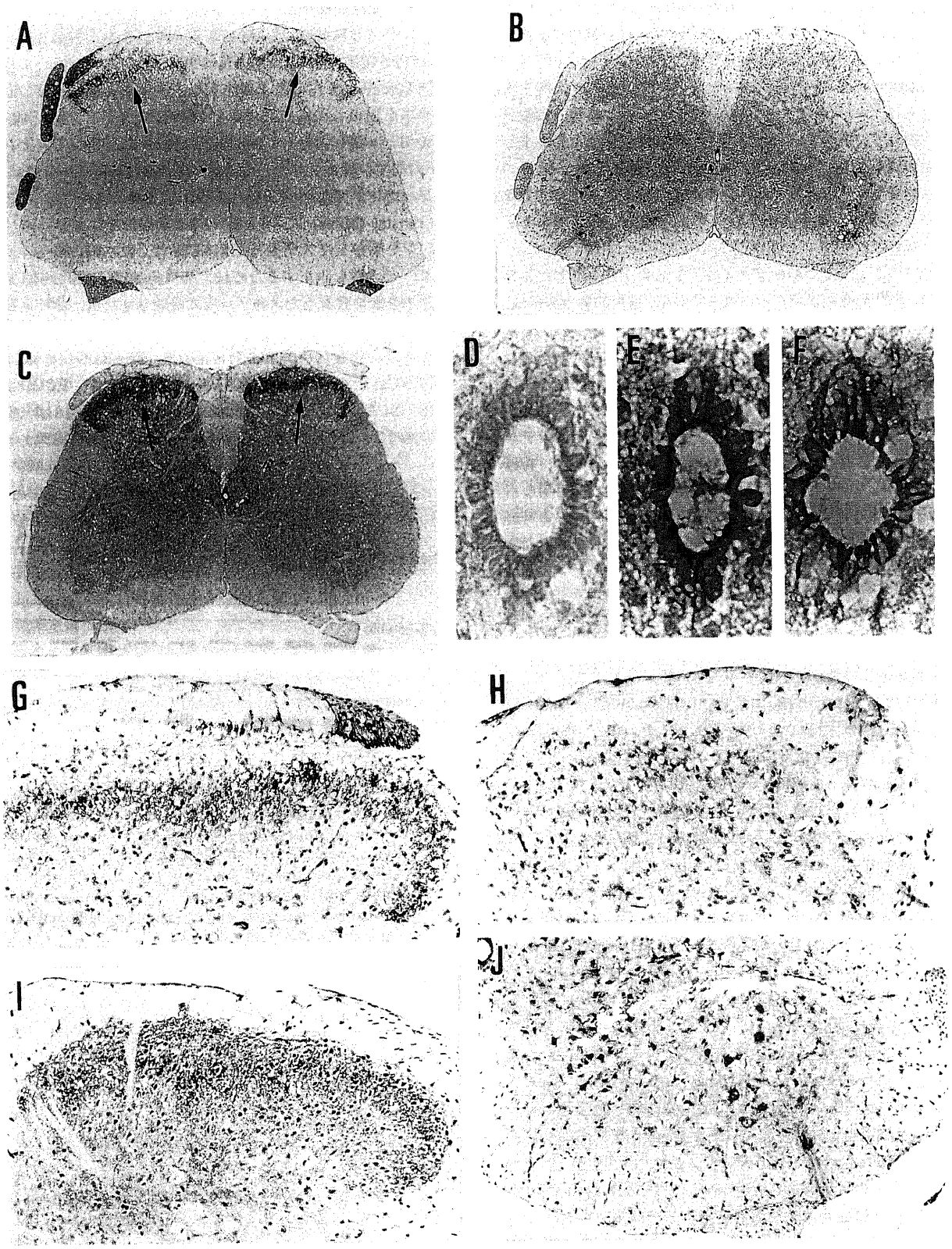

Fig. 3. Immunostaining for E-cadherin (A, D, G), α E-catenin (B, E, H, J), and α N-catenin (C, F, I) on the adjacent transverse sections of the normal mouse spinal cord (A, B, C), central canal (D, E, F), dorsal horn (G, H, I), and ventral horn (J). A: E-cadherin was expressed in the dorsal and ventral roots and lamina II (arrows). B: α E-catenin was expressed in the spinal cord gray matter, especially in ventral horn and ependymal cells of the central canal. C: α N-catenin was expressed in the spinal cord gray matter, especially in an area of the lamina II (arrows) and ependymal cells of the central canal. D, E, and F: Detail of Figure 3A, 3B, and 3C, showing the reaction product in the central canal. The ependymal cells expressed α E-catenin (E) and α N-catenin (F) but not E-cadherin (D). G, H, and I: Detail of Figure 3A, 3B, and 3C, showing the reaction product at the dorsal horn. J: Detail of Figure 3B, showing that some of the neuronal cell bodies at the ventral horn expressed α E-catenin. G, H, I, J were counterstained by hematoxylin. A, B, C, × 12.5; D, E, F, × 200; G, H, I, × 50; J, × 25

もしくはヤギビオチン化抗ウサギ抗体と反応させ，アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin-peroxidase complex) 法とヂアミノベンヂジン (3, 3-diaminobenzidine) により発色させた．

Ⅳ．免疫沈降法

抗ラットイムノグロブリンアガロースビーズ(American Qualex, Calle Negocio, USA)を0.1％BSAを含むTBS-Caにて洗浄後，ECCD-2を加え4時間攪拌した．マウス組織 (脊髄，三叉神経，後根神経節，坐骨神経) を溶解液 (1％トライトンX-100, 1％ノニデットP-40, 2mM フェニルメチルスルフォニルフロライド，20 μg/ml ロイペプチン，2mM 塩化カルシウム，50mM TBS) [40)41)]に溶解し，1500回転にて20分間遠心した．三叉神経は，イムノブロット解析と同様の部分，脊髄は周辺部の組織を用いた．遠心後の上清を，非特異的反応を除くために抗体を加えないアガロースビーズと反応させた．さらに抗体を加えたビーズと1晩攪拌したのち遠心後上清を除き，ビーズを溶解液にて6回洗浄を行った．ビーズに溶解液と5％2-メルカプトエタノールを含むSDS 緩衝液を加え95℃にて5分間温浴させ，ビーズとタンパクの結合を解離させた．遠心後，上清を回収しイムノブロットによる解析を行った．

成　　績

Ⅰ．イムノブロット解析

それぞれの神経組織におけるカドヘリン，カテニン，アクチンの存在の有無をイムノブロットにより解析した．E-カドヘリンは三叉神経，脊髄後根，後根神経節，坐骨神経と脊髄周辺部に発現していた．脳幹における発現はごくわずかであった．大脳，小脳，そして中心管を含む脊髄中心部は陰性であった (図1)．α E-カテニンは検索した全ての組織 (大脳，小脳，脳幹，三叉神経，脊髄中心部，脊髄周辺部，後根，後根神経節，坐骨神経) に発現していた (図1)．α N-カテニンは中枢神経 (大脳，小脳，脳幹，脊髄) に発現しており，後根神経節にはごくわず

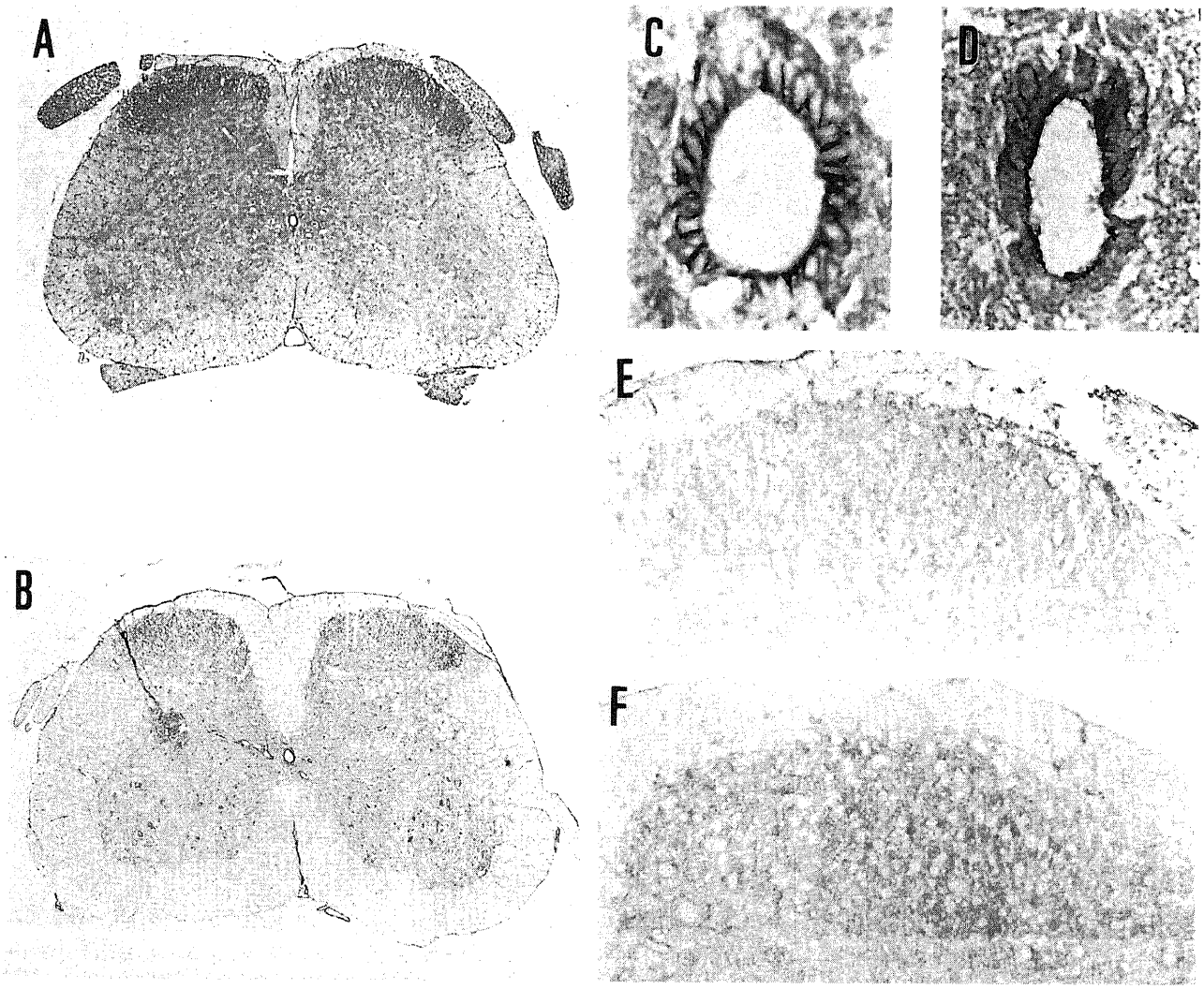

Fig. 4. Immunostaining for β-catenin (A, C, E), and actin (B, D, F) on the adjacent transverse sections of the normal mouse spinal cord (A, B), central canal (C, D), and dorsal horn (E, F). β-catenin was expressed in the spinal cord gray matter and ependymal cells of the central canal. B: Actin was expressed in the spinal cord gray matter and ependymal cells of the central canal. C, D: Detail of Figure 4A and 4B, showing the reaction product in the central canal. The ependymal cells expressed β-catenin at their cell-cell contact (C), whereas expressed actin at their apical portion. E, F: Details of Figure 4A, 4B, showing the reaction product at the dorsal horn. A, B, × 12.5; C, D, × 200; E, F, × 50

かに陽性反応が見られたが，三叉神経，脊髄後根，坐骨神経には陰性であった (図1)．β-カテニン，アクチンは，検索した神経組織全てに陽性であった (図2)．

Ⅱ．E-カドヘリン，カテニン，アクチンの局在

免疫組織化学的手法によりタンパクの局在を検討した．E-カドヘリンは，脊髄内では，Rexed第Ⅱ層 (外側部，内側部ともに) のニューロピルに限局して存在していた (図3 A, G)．脊髄前根，後根，後根神経節，坐骨神経においてもE-カドヘリンの発現が見られ，後根神経節では，ほぼ全ての衛星細胞の細胞質，小型の神経節細胞の細胞質 (図5 A)，坐骨神経においては髄鞘の外側部ならびにシュワン細胞の細胞体が陽性であった (図6 A)．α E-カテニンは，脊髄中心管の上衣細胞と前角神経細胞の細胞質に陽性で，さらに脊髄灰白質全体が淡く陽性であった (図3 B, E, H, J)．後根神経節では，ほぼ全ての衛星細胞と神経節細胞の細胞質が陽性であった (図5 B, C)．後根，坐骨神経ではシュワン細胞の細胞体と髄鞘の外側部に陽性であった (図6 B, 7)．α N-カテニンは，脊髄では中心管の上衣細胞と灰白質全体に発現し，特にRexed第Ⅱ層 (外側部，内側部ともに) のニューロピルに強陽性であった (図3 C, F, I)．後根神経節では，一部の衛星細胞と神経節細胞に陽性であった (図5 D)．β-カテニンは，脊髄では灰白質と中心管の上衣細胞の細胞質周辺部に陽性であった (図4 A, C, E)．後根神経節，三叉神経節では，全ての衛星細胞と神経節細胞の細胞質に (図5 E)，坐骨神経，三叉神経ではシュワン細胞の細胞体と髄鞘の外側部に陽性であった (図6 C)．アクチンは，脊髄では主に灰白質と中心管の管腔側に陽性で (図4 B, D, F)，後根神経節，三叉神経節では，全ての衛星細胞と神経節細胞の細胞質に (図5 F)，坐骨神経，三叉神経ではシュワン細胞の細胞体に陽性であった (図6 D)．

Ⅲ．免疫沈降法

E-カドヘリンの細胞内結合タンパクを同定する目的で，抗E-カドヘリン抗体(ECCD-2)により免疫沈降を行った．α E-カテニンは，三叉神経，後根神経節，坐骨神経で検出されたが，脊髄では認められなかった．α N-カテニンは，上記いずれの組織においても検出されなかった (図8)．

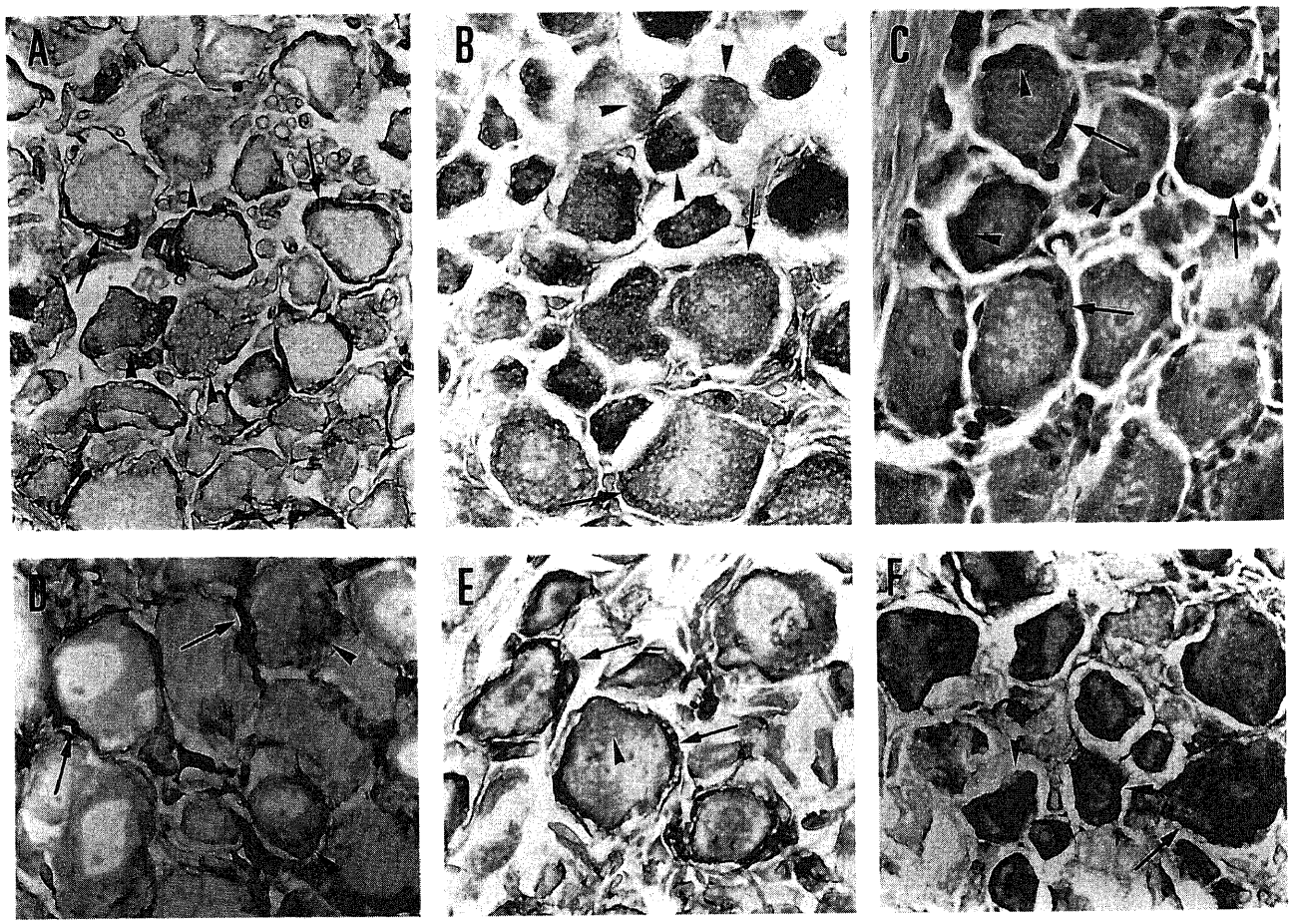

Fig.5. Immunostaining for E-cadherin (A), α E-catenin (B, C), α N-catenin (D), β-catenin (E), and actin (F) on the adjacent transverse sections of the normal mouse dorsal root ganglion. A: The perikaya of small-sized cell bodies (arrowheads) and the surface of the neuronal cell bodies (arrows) show reaction product. B: The perikaya of neuronal cell bodies (arrowheads) and the surface of the neuronal cell bodies (arrows) show reaction product. C: The section counterstained by hematoxylin after the immunostaining clearly show that the relationship between α E-catenin positive neuronal cell bodies (arrowheads) and satellite cells (arrows). D: The perikaya of some neuronal cell bodies (arrowheads) and the surface (arrows) are positive for α N-catenin. E: The perikaya of almost all neuronal cell bodies (arrowheads) and the surface (arrows) are positive for β-catenin. F: The perikaya of almost all neuronal cell bodies (arrowheads) and the surface (arrows) are strongly positive for actin. A, B, C, D, E, ×200

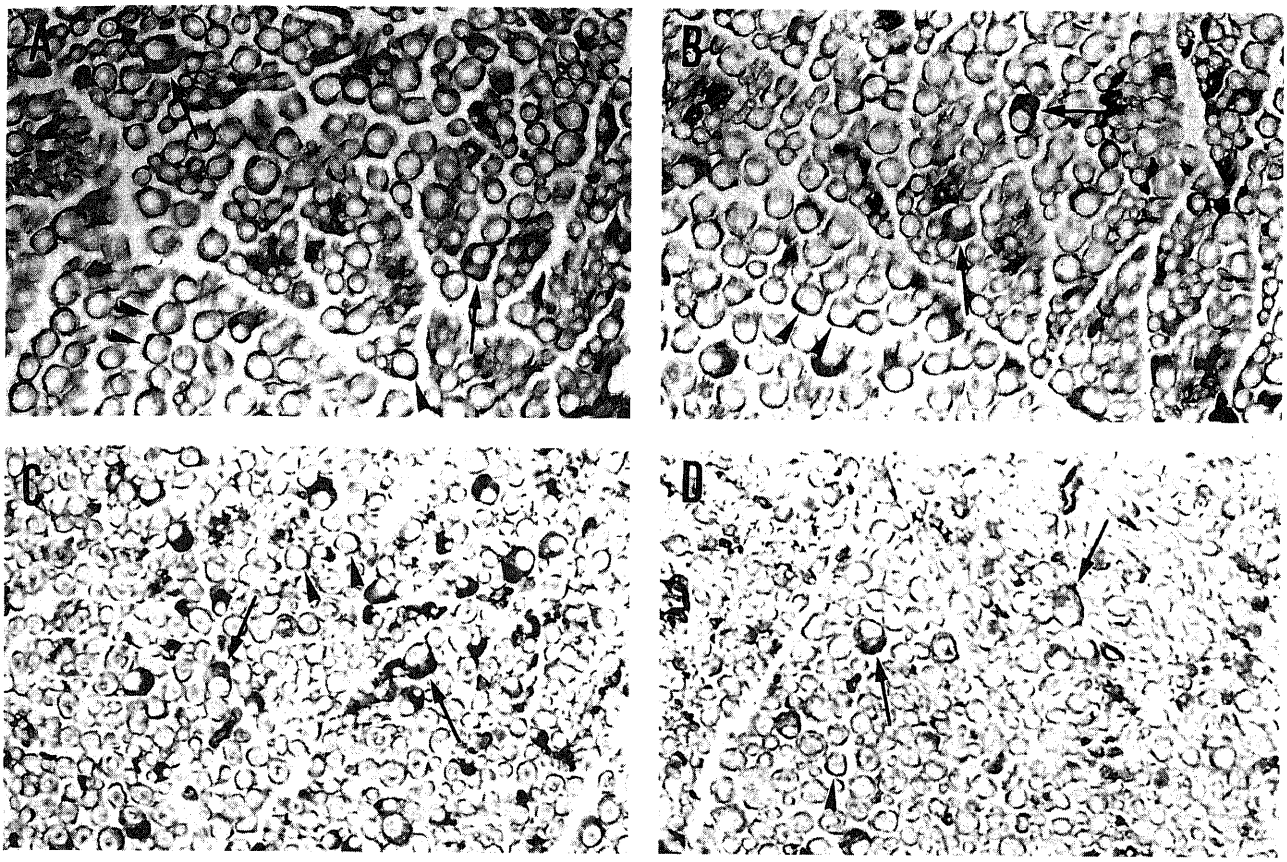

Fig. 6. Immunostaining for E-cadherin (A), α E-catenin (B), β-catenin (C), and actin (D) on the adjacent transverse sections of the normal mouse sciatic nerve. Surface of myelin (arrowheads) and Schwann cell bodies (arrows) are positive for each antibodies. A, B, C, D, × 200

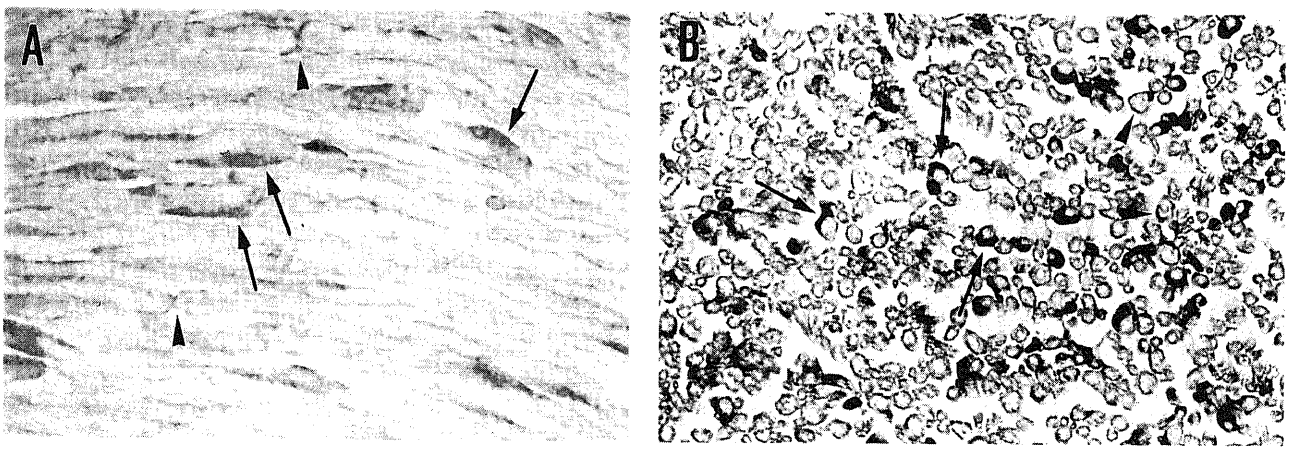

Fig. 7. Immunostaining for α E-catenin of the mouse dorsal root. A: A longitudinal section clearly shows that myelinating Schwann cell bodies (arrows) as well as paranodal portion (arrowheads) are positive for α E-catenin. B: A transverse section of dorsal root, showing the reaction product on the surface of myelin (arrowheads) and Schwann cell bodies (arrows). A, B, × 200

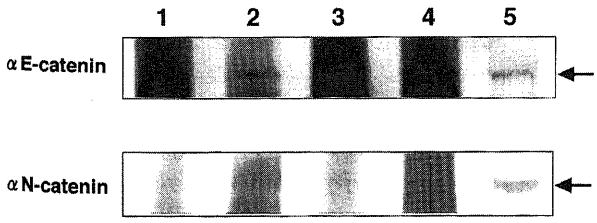

Fig. 8 Immunoblot analysis of the mouse spinal cord (line 1), trigeminal nerve (line 2), dorsal root ganglion (line 3), and sciatic nerve (line 4) with anti-α E-catenin, and anti-α N-catenin antibody after immunoprecipitation using anti-E-cadherin antibody (ECCD-2). Line 5 shows Western blotting of normal dorsal root ganglion (α E-catenin) and normal cerebral cortex (α N-catenin) as control. A band comigrating with α E-catenin are seen in the line 2, 3, and 4, but not line 1. No band with α N-catenin can be seen.

考 察

本研究において，マウス後根神経節，三叉神経，坐骨神経においては，カルシウム依存性接着分子E-カドヘリンに結合する細胞内タンパクのα-カテニンは，αE型であることが初めて明らかとなった．α-カテニンには2つのサブタイプ，αE-カテニンとαN-カテニンとが存在する．ともに分子量は102 kDaであるが，αN-カテニンにはスプライシングにより分子量113 kDaのアイソフォームが存在する．αE-カテニンとαN-カテニンはアミノ酸配列では約82％の相同性を持っている[32]．αN-カテニンは主に発生の初期の神経系で発現し，脳神経と後根神経節の神経線維，神経管で認められる[39]．また最近になり，ニワトリの大脳，小脳のシナプス小胞のあるアクティブゾーンに隣接した部位にαN-カテニンが発現することが判明し[42]，同様の部位にN-カドヘリンも発現することからシナプス構造の接着に関与するものと考えられている．αE-カテニンは，心筋，肝臓，膵臓，腎臓，小腸に認められるが，中枢神経系では，成熟マウスの脊髄の上衣細胞と網膜での発現が報告されている[40]．本研究においてαE-カテニンは，タンパクレベルでは，大脳，小脳，脳幹，三叉神経，脊髄，後根，後根神経節，坐骨神経に発現していた．その局在は，脊髄では上衣細胞に加えて，前角細胞を含む灰白質全体に，末梢神経系では，後根神経節の神経節細胞，衛星細胞の細胞質，シュワン細胞の細胞体，さらに髄鞘外側部に発現していることが明らかになった．

αE-カテニンは，ラット肝臓のアドヘレンスジャンクションからE-カドヘリンと関連したタンパクとして見つかり[34]，αN-カテニンは，N-カドヘリンに関連したタンパクとしてニワトリの胎生期の脳の培養細胞から同定された[32]．E-カドヘリンは存在するが接着能を持たない肺癌の細胞株PC-9に，αN-カテニンを強制発現させることでE-カドヘリンを介した接着能が出現することから，αN-カテニンがE-カドヘリンの接着能を制御しているものと考えられている[43]．また，E-カドヘリンを発現する癌腫において，α-カテニンの発現低下と，リンパ節転移や遠隔転移が相関する事実は，α-カテニンによるE-カドヘリンの細胞接着能の制御を支持するものである[44]．しかし，その組み合わせは，E-カドヘリン-αE-カテニン，N-カドヘリン-αN-カテニンのみではなく，心臓，脊索では，N-カドヘリンは発現しているが，αN-カテニンは発現しておらず，αE-カテニンと複合体を形成していると想像されている[32]．また，神経系では，脊髄Rexed Ⅱ層におけるE-カドヘリンとαN-カテニンの発現が，共に坐骨神経に損傷を加えた後に低下し，末梢の神経再生とともに同調して再出現することより，この部位のE-カドヘリンは，αN-カテニンと複合体を形成している可能性が示唆されている[37]．イムノブロットの結果は，坐骨神経，三叉神経には，αN-カテニン存在せず，E-カドヘリン，αE-カテニンが発現していた．E-カドヘリン，αE-カテニンとも免疫染色でシュワン細胞に認められ，さらに，免疫沈降法においても両者の結合が確認された．以上より，シュワン細胞におけるE-カドヘリンの接着は，αE-カテニンにより制御されるものと思われる．

中枢神経系では，カドヘリンはミエリン形成とともに軸索ではほとんど認められなくなるが，末梢神経では，シュミットーランターマン切痕部位の膜の裏打ち構造にE-カドヘリンが認められる[15]．また，軸索再生時，髄鞘再形成時に，反応性シュワン細胞の接着部分にE-カドヘリンが発現する[16]．したがって，E-カドヘリン-αE-カテニン複合体が，末梢神経のミエリンの形成，維持に関与しているものと思われる．後根神経節では，衛星細胞と神経節細胞，衛星細胞同士の接着に関与しているものと思われる．

今回の結果から，後根神経節のみならず，脊髄後角にもαE-カテニン，αN-カテニンの両型のα-カテニンが共存していることがわかった．しかし，免疫沈降法の手技では，脊髄Rexed Ⅱ層に発現するE-カドヘリンと結合するα-カテニンがいずれの型であるかは特定できなかった．これは，この部位でのα-カテニンの発現量が少ないことに加えて，発現していたαE-カテニン，αN-カテニンのほとんどが，E-カドヘリン以外のカドヘリンと結合している可能性も残される．一方電顕による観察では，脊髄でのE-カドヘリンは一部の無髄神経軸索間に存在し，シナプス接合部には認められない[14]．大脳，小脳ではαN-カテニン，N-カドヘリンが主にシナプスのアクティブゾーンに隣接して存在している[42)45]．以上より，脊髄のシナプスではN-カドヘリン-αN-カテニン複合体が，軸索束形成部分ではE-カドヘリン-αE-カテニン複合体が各々発現している可能性もある．

脊髄でのE-カドヘリンの発現は，サブスタンスP，ソマトスタチンの発現部位との比較からRexed Ⅱ層とされる[13]．脊髄Rexed Ⅱ層の外側部には，侵害受容器に分布する一次感覚神経の中枢側の軸索の多くが終止する[46]．痛覚情報を伝達する一次感覚神経の細胞体は，小型の細胞であることが知られている[46]．Simamuraら[13]の培養系の検索では，小型の後根神経節細胞のみがE-カドヘリン陽性であり，E-カドヘリンは，痛覚情報を伝達する一次感覚神経の細胞体に局在することが示唆されている[37]．これは，本研究の生体内の後根神経節においても，E-カドヘリン陽性細胞が小型の細胞であったことに一致する．今回の詳細な検討によりE-カドヘリンは，Ⅱ層の外側部のみならず内側部にも存在した．このことは，E-カドヘリンが非侵害性機械刺激に関する細胞体及び軸索にも存在する可能性を示すものである．

本研究で，検索し得た全ての神経組織にβ-カテニンの発現が見られた．β-カテニンには，細胞膜直下に存在しカドヘリンと結合することでその接着に関与するものと，細胞質や核に局在しシグナル伝達に関与するものとがある．前者は，カドヘリンとα-カテニンの間に介在することで，接着機能のオン・オフのスイッチとして働くものと考えられている[47]．一方，後者は，ウィントによるシグナル伝達に関与すると考えられている[48]．分泌タンパクであるウィントの刺激を受けて，β-カテニンが細胞内で核内へ移行し，転写調節を行い，その結果，発生期に神経管の形成を誘導することが知られている[49]．また，家族性大腸ポリポーシスの原因遺伝子(adenomatous polyposis coli, APC) の産物がβ-カテニンと結合する[50)51]，あるいはある種の腫瘍細胞で変異β-カテニンが発見されるなど，β-カテニンと癌抑制遺伝子との関連が示唆されている[52)53]．神経系においてもβ-カテニンが，細胞外から核へのシグナル伝達の機能を有する可能性があり，今後さらなる検索が必要と思われる．

結 論

マウス神経系における，カルシウム依存性細胞接着分子E-カドヘリンと，その関連細胞内タンパクであるカテニンの発現と結合を免疫組織化学および生化学的に検討した．

1. E-カドヘリン，αE-カテニンともに、三叉神経，後根神

経節，坐骨神経に発現していた．

2. 免疫沈降法において，三叉神経，後根神経節，坐骨神経におけるE-カドヘリン-αE-カテニン複合体の存在が明らかとなった．

3. E-カドヘリンは，後根神経節では，衛星細胞と小さな神経節細胞に陽性であった．αE-カテニンは，ほとんど全ての衛星細胞と神経節細胞に陽性であった．αN-カテニンは，一部の衛星細胞と神経節細胞に陽性であった．

4. 坐骨神経，三叉神経では，E-カドヘリン，αE-カテニンともにシュワン細胞の細胞体に陽性であった．

5. 脊髄では，E-カドヘリンはRexed Ⅱ層のみに陽性であった．αE-カテニンは，中心管の上衣細胞，前角細胞に陽性で，灰白質には淡く陽性であった．αN-カテニンは，灰白質全体，特にRexed Ⅱ層と上衣細胞に強く陽性であった．

以上の結果より，三叉神経，坐骨神経そして後根神経節においては，E-カドヘリンとαE-カテニンが複合体を形成していると考えられた．この複合体は，脊髄と脊髄神経の一部の軸索束形成に加えて，後根神経節では衛星細胞の，三叉神経，坐骨神経においてはシュワン細胞の，それぞれの末梢性グリアの機能発現に関与していると考えられた．

謝　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜った恩師金沢大学医学部脳神経外科学講座山下純宏教授に深甚の謝意を表します．また，直接御指導いただいた同教室長谷川光広講師に深謝いたします．更に，抗体を提供していただいた京都大学理学部生物物理学教室竹市雅俊教授，京都大学医学部分子細胞情報学講座永渕昭良博士に厚く御礼申し上げます．本研究に御協力頂いた脳神経外科学教室の諸先生に感謝の意を表します．なお本論文の一部は，神経組織の成長再生移植研究会第12回学術集会(1997，京都)，第56回日本脳神経外科学会総会(1997，大阪)において発表した．

文　献

1) Edelman GM, Crossin KL. Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. Annu Rev Biochem 60:150-190, 1991

2) Reichardt LF, Tomaselli KJ. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. Annu Rev Neurosci 14: 531-570, 1991

3) Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. Annu Rev Biochem 59: 237-252, 1990

4) Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science 251: 1451-1455, 1991

5) Takeichi M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. J Cell Biol 75: 467-474, 1977

6) Yoshida C, Takeichi M. Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. Cell 28: 217-224, 1982

7) Bixby JL. Diversity of axonal growth-promoting receptors and regulation of their function. Curr Opin Neurobiol 2: 66-69, 1992

8) Hatta K, Takeichi M. Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. Nature 320: 447-449, 1986

9) Inuzuka H, Miyatani S, Takeichi M. R-cadherin: a novel Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina. Neuron 7: 69-79, 1991

10) Ranscht B, Dours Z Mt. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. Neuron 7: 391-402, 1991

11) Napolitano EW, Venstrom K, Wheeler EF, Reichardt LF. Molecular cloning and characterization of B-cadherin, a novel chick cadherin. J Cell Biol 113: 893-905, 1991

12) Redies C, Takeichi M. Expression of N-cadherin mRNA during development of the mouse brain. Dev Dyn 197: 26-39, 1993

13) Shimamura K, Takahashi T, Takeichi M. E-cadherin expression in a particular subset of sensory neurons. Dev Biol 152: 242-254, 1992

14) Uchiyama N, Hasegawa M, Yamashima T, Yamashita J, Shimamura K, Takeichi, M. Immunoelectron microscopic localization of E-cadherin in dorsal root ganglia, dorsal root and dorsal horn of postnatal mice. J Neurocytol 23: 460-468, 1994

15) Fannon A, M.Sherman DL, Ilyina, Gragerova G, Brophy PJ, Friedrich Vl Jr, Colman DR. Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions. J Cell Biol 129: 189-202, 1995

16) Hasegawa M, Seto A, Uchiyama N, Kida S, Yamashima T, Yamashita J. Localization of E-cadherin in peripheral glia after nerve injury and repair. J Neuropathol Exp Neurol 55: 424-434, 1996

17) Redies C, Takeichi M. Cadherins in the developing central nervous system: an adhesive code for segmental and functional subdivisions. Dev Biol 180: 413-423, 1996

18) Inoue T, Chisaka O, Matsunami H, Takeichi M. Cadherin-6 expression transiently delineates specific rhombomeres, other neural tube subdivisions, and neural crest subpopulations in mouse embryos. Dev Biol 183: 183-194, 1997

19) Korematsu K, Redies C. Restricted expression of cadherin-8 in segmental and functional subdivisions of the embryonic mouse brain. Dev Dyn 208: 178-179, 1997

20) Fushimi D, Arndt K, Takeichi M, Redies C. Cloning and expression analysis of cadherin-10 in the CNS of the chicken embryo. Dev Dyn 209: 269-285, 1997

21) Overduin M, Harvey, TS, Bagby S, Tong KI, Yau P, Takeichi M, Ikura M. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. Science 267: 386-389, 1995

22) Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. Nature 374: 327-337, 1995

23) Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi, M. Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. J Cell Biol 152: 242-254, 1992

24) Aghib DF, McCrea PD. The E-cadherin complex contains the src substrate p120. Exp Cell Res 218: 359-369, 1995

25) Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R,

Hoschuetzky, H. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. J Cell Sci 107: 3655-3663, 1994

26) Jou TS, Stewart DB, Stappert J, Nelson WJ, Marrs JA. Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 5067-5071, 1995

27) Knudsen KA, Wheelock MJ. Plakoglobin, or an 83-kD homologue distinct from beta-catenin, interacts with E-cadherin and N-cadherin. J Cell Biol 118: 671-679, 1992

28) Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS. Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 8813-8817, 1995

29) Nieset JE, Redfield AR, Jin F, Knudsen KA, Johnson KR, Wheelock MJ. Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. J Cell Sci 110: 1013-1022, 1997

30) Nagafuchi , Takeichi M. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. EMBO J 7: 3679-3684, 1988

31) Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 4246-4250, 1990

32) Hirano S, Kimoto N, Shimoyama Y, Hirohashi S, Takeichi, M. Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. Cell 70: 293-301, 1992

33) Shimoyama Y, Nagafuchi A, Fujita S, Gotoh M, Takeichi M, Tsukita S, Hirohashi S. Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: possible involvement of loss of alpha-catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. Cancer Res 52: 5770-5774, 1992

34) Nagafuchi A, Takeichi M, Tsukita S. The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. Cell 65: 849-857, 1991

35) Herrenknecht K, Ozawa M, Eckerskorn C, Lottspeich F, Lenter M, Kemler R. The uvomorolin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue. Proc Natl Acad Sci USA 88: 9156-9160, 1991

36) Hirano S, Takeichi M. Differential expression of alpha N-catenin and N-cadherin during early development of chicken embryos. Int J Dev Biol 38: 379-384, 1994

37) 瀬戸 陽. マウス末梢軸索損傷後の一次感覚神経における上皮型カドヘリンとカドヘリン関連細胞質因子α N-カテニンの発現変化とその意義の検討. 十全医会誌106: 33-43, 1997

38) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970

39) Uchida N, Shimamura K, Miyatani S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeichi M. Mouse alpha N-catenin: Two isoforms, specific expression in the nervous system, and chromosomal localization of the gene. Dev Biol 163: 75-85, 1994

40) Nagafuchi A, Tsukita S. The loss of the expression of α catenin, the 102 kD cadherin associated protein, in central nervous tissues during dedelopment. Develop. Growth & Diffef 36: 59-71, 1994

41) Takayama T, Shiozaki H, Shibamoto S, Oka H, Kimura Y, Tamura S, Inoue M, Monden T, Ito F, Monden M. Beta-catenin expression in human cancers. Am J Pathol 148: 39-46, 1996

42) Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, Takeichi M. The catenin cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. J Cell Biol 135: 767-779, 1996

43) Watabe M, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M. Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. J Cell Biol 127: 247-256, 1994

44) Matsui S, Shiozaki H, Inoue M, Tamura S, Doki Y, Kadowaki T, Iwazawa T, Shimaya K, Nagafuchi A, Tsukita S. Immunohistochemical evaluation of alpha-catenin expression in human gastric cancer. Virchows Arch 424: 375-381, 1994

45) Fannon A, M.Colman DR. A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. Neuron 17: 423-434, 1996

46) Perl ER. Function of dorsal root ganglion neurons: an overview. *In* Scott SA (ed), Sensory neurons, 1st ed, p3-23, Oxford University Press, New York, 1992

47) Nagafuchi A, Ishihara S ,Tsukita S. The roles of catenins in the cadherin-mediated cell adhesion: functional analysis of E-cadherin-alpha catenin fusion molecules. J Cell Biol 127: 235-245, 1994

48) Funayama N, Fagotto F, McCrea P ,Gumbiner BM. Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta-catenin: evidence for intracellular signaling. J Cell Biol 128: 959-968, 1995

49) Takeda H, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Behrens J, Birchmeier W ,Tsukita S. V-src kinase shifts the cadherin-based cell adhesion from the strong to the weak state and beta catenin is not required for the shift. J Cell Biol 131: 1839-1847, 1995

50) Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S ,Polakis P. Association of the APC gene product with beta-catenin. Science 262: 1731-1734, 1993

51) Su LK, Vogelstein B ,Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. Science 262: 1734-1737, 1993

52) Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B ,Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science 275: 1787-1790, 1997

53) Rubinfeld B, Robbins P, ElGamil M, Albert I, Porfiri E , Polakis P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. Science 275: 1790-1792, 1997

Expressions and Localizations of E-Cadherin and α and β-Catenins in Mouse Nervous System Naoki Muramatsu, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **107,** 108 — 117 (1998)

Key words α E-catenin, α N-catenin, E-cadherin, immunoprecipitation, nervous system

Abstract

The calcium dependent cell adhesion molecule, E-cadherin, plays important roles in axon-axon contacts and stabilization of the peripheral glial network. α and β-catenins form complexes with E-cadherin in the cytoplasmic region, and regulate cadherin functions. The present study was performed to examine the expressions and localizations of E-cadherin and α- and β-catenins in mouse neural tissues (cerebral cortex, cerebellum, brain stem, trigeminal nerve, spinal cord, dorsal root, DRG, and sciatic nerve) by immunoblot and immunohistochemical analyses, to elucidate the roles of cadherin-catenin complex in the nervous system. In immunoblot analysis, E-cadherin was expressed in the trigeminal nerve, spinal cord, dorsal root, DRG, and sciatic nerve. α E-catenin and β-catenin were expressed in all tissues examined. α N-catenin was expressed in the cerebral cortex, cerebellum, brain stem, spinal cord, and DRG. Immunohistochemically, E-cadherin was expressed in the dorsal root, lamina II of the spinal cord, satellite cells and small sized neuronal cell bodies in the DRG, and Schwann cells. α E-catenin was expressed in some of neurons and ependymal cells of the central canal of the spinal cord, satellite cells, some neuronal cell bodies in the DRG, and Schwann cells. α N-catenin was diffusely expressed in the gray matter of the spinal cord with enhanced immunoreactivity in lamina II and the central canal. Satellite cells and some neuronal cell bodies in DRG were also positive. Immunoprecipitation using anti-E-cadherin antibody resulted in α E-catenin forming a complex with E-cadherin in the trigeminal nerve, DRG, and sciatic nerve, but not in the spinal cord. E-cadherin-α N-catenin complex was not detectable. These results suggested that there are several types of cadherin-catenin complexes in the nervous system and that E-cadherin-α E-catenin complex plays various roles in glial contact specifically in the peripheral nerves.