

「ゲノムの構造と機能」

平成 12 年度採択研究代表者

八木 健

(大阪大学細胞生体工学センター 教授)

「クラスター型カドヘリンのゲノム構造・機能の解析」

1. 研究実施の概要

研究のねらい:

脳神経系は多様化した細胞種が、高度に組織化されたシステムであり、学習・記憶を司る。これと類似したシステムとして免疫系が知られている。免疫系ではイムノグロブリン遺伝子群のゲノム再構成と発現制御により、外来の抗原に対する抗体の作製と記憶がもたらされている。近年我々は、脳機能に関わる Fyn チロシンリン酸化酵素と共役する分子群を同定する中で、シナプスに局在する新規カドヘリン(CNR)ファミリーを得、この CNR ファミリー遺伝子がマウス及びヒトのゲノム上でイムノグロブリンと類似した遺伝子クラスターを構成していることを明らかにした。また最近、各種の DNA 連結、修復酵素を欠損させたマウスでは、メカニズムは不明であるが神経細胞死がおこることが報告されている。これらの状況は、神経細胞分化にともなうクラスター型カドヘリンのゲノム構造変化の可能性を示唆するものである。そこで、本研究では我々が今までに得た CNR カドヘリンを中心にクラスター型カドヘリンのゲノム構造を解析し、脳神経系細胞での体細胞的なゲノム構造変化を解析したいと考えている。

これまでの研究の概要、成果、今後の見通し:

本研究では、これまでにマウス大脳皮質の発生・発達に伴い、CNR ファミリーの転写産物に突然変異が蓄積されている可能性を見いだした。また、この突然変異によるアミノ酸配列の変化は、第一カドヘリンドメインに偏りがあることより、体細胞レベルでの突然変異と神経回路形成の関連性について興味を持たれた。本年度は、この結果よりマウス神経細胞の DNA レベルでの変換を明らかにする技術の解析を行った。神経細胞は分化すると細胞分裂が止まる。体細胞レベルでの DNA レベルでの変換を明らかにするためには、分化した神経細胞核をクローン化し、DNA レベルでの変換を解析する系を立ち上げする必要がある。そこで本年度は、未分化神経細胞と分化神経細胞の核を用いてクローンマウスの作製を行った。その結果、分化した神経細胞核ではクローンマウス胚が胎生致死になることが明らかになった。この結果は、分化神経細胞の核を用いてクローンマウス胚が得られる結果を示したものであり、分化神経細胞核のクローン化が可能であることを示唆している。今後は、この分化神経細胞核を用いたクローンマウスを作製し、DNA レベルでの変異、変換を明らかにしたいと考えている。本年度の結果は、本戦略的基礎研究のテーマが技術的に可能で

あることを示した結果であるとともに、今後分化神経細胞での核情報の異常や変換を総合的に捉える方向性を示したものである。

2. 研究実施内容

本研究では、クラスター型カドヘリンのゲノム構造と機能を明らかにすることを目的として以下の研究を行っている。

研究実施概要

1) CNR ファミリーを含めたクラスター型カドヘリンのゲノム構造の決定

CNR ファミリーを含めたクラスター型カドヘリンのマウスゲノミック BAC ライブラリーをスクリーニングし、全配列を決定する。得られたマウスの塩基配列とヒトの塩基配列を比較することにより、異種間で保存されたゲノム遺伝子領域を見つける。これにより、クラスター型カドヘリンの遺伝子発現制御、遺伝子組み換えの可能性を検討する。また、得られた塩基配列は、神経細胞のゲノム構造解析の基盤として用いる。

2) 成体マウス脳のゲノム DNA ライブラリーの作製

脳神経系の細胞でのゲノム構造が、体細胞レベルで変化している可能性を調べるために、1)で明らかになったゲノム構造をもとに、PCR 法を行い、体細胞レベルでのゲノム構造変化を調べる。また、直接調べる方法として、マウス成体脳よりゲノミック DNA を調整しマウス脳ゲノミックライブラリーを作製する。また、このライブラリーを用いてクラスター型カドヘリンのゲノム領域をスクリーニングし、ゲノム構造の変化を解析する。しかし、この場合神経細胞、グリア細胞などの細胞種を特定したライブラリー作製は困難であるので、脳全体としてライブラリーを作製しスクリーニングする必要がある。得られたクローンについてはゲノム構造を解析し、変化が認められた場合はPCR法を用いて法則性を確認する。

3) 神経細胞の核を用いたクローンマウス作製

2)での問題点を克服した系を確立するために、分化した神経細胞より核をとり、その核をマウス除核未受精卵に導入し、クローンマウス作製を試みる。この核導入胚よりマウス胚幹細胞を樹立することにより神経核クローン細胞株、また仮親の子宮で発生をさせることによりクローンマウス胚及び個体を得る。得られた細胞、胚、個体の異常を様々なレベルにより解析することにより、ゲノム構造の変化の手掛かりを得る。ハワイ大学の柳町グループを中心に研究を行う。

4) ゲノム構造変化の生理学的意味の解析

ゲノム構造変化の生理学的意義を解析するために、1)ゲノム構造変化がどのような発生段階、環境因子、行動に関係しておこるかを解析する。ゲノム構造変化によるマーカー遺伝子発現誘導マウスを作製することにより、詳細な解析を行う。2)ゲノム構造変化を導入することによる発生、神経回路形成、行動制御の異常を解析する。予想されるゲノム構造変化を導入及び誘導できる遺伝子変換マウスを作製することにより、体細胞レベルでのゲノム構造変化の生理学的意義、特に記憶のメカニズムに迫る。

本年度の研究実施成果:

1) クラスター型カドヘリンのゲノム構造の決定

本年度は、マウス、ヒトの CNR を含むクラスター型カドヘリンのゲノム構造が完全に明らかとなった。この遺伝子構造をもとに各種間で保存されているゲノム構造を解析することができた。この保存されている遺伝子構造についてはトランスジェニックマウスを用いて、遺伝子構造とクラスター型カドヘリンの発現制御などの役割について明らかにしていきたいと考えている。

また本年度、ゼブラフィッシュ、メダカ、ラット、ニワトリのクラスター型カドヘリンの BAC ライブラリーの単離に成功し、これらのゲノム構造の解析を慶應大学のグループとともにに行っている。大脳皮質進化の過程で重要となる両生類ゲノム構造の解析については、モデル動物を考える必要がある。本研究では、*Xenopus tropicalis* が2倍体の染色体構造をもつことより、この *Xenopus tropicalis* を両生類のモデルと考え、この BAC ライブラリーの作製を慶應大学グループとともに試みた。その結果、平均インサート長、約 100kb の BAC ライブラリーの作製に成功した。来年度は、この *Xenopus tropicalis* を含め、魚類、両生類、鳥類、霊長類のクラスター型カドヘリンのゲノム構造を明らかにしたいと考えている。

2) 成体マウス脳のゲノム DNA ライブラリーの作製

本年度、マウス成体脳よりゲノム DNA を抽出しゲノム DNA ライブラリーの作製を行い、EMBL フェージにてライブラリーの作製に成功した。このライブラリーより CNR クラスターの定常領域をプローブとしてスクリーニングを行った結果、1クローンで生殖系列の DNA 構造とは全く異なるゲノム構造が明らかとなった。このゲノム構造の変化が、偶然起こったものであるのか、プログラムされて起こっているのかについて、現在 PCR 法およびサザンブロット法を用いて確認している。この結果は、マウス脳においてクラスター型カドヘリンの体細胞レベルでのゲノム構造の変化を示唆する結果として興味深い。

3) 神経細胞の核を用いたクローンマウス作製

本年度、ハワイ大グループとともに神経細胞核を用いたクローンマウス作製を試みた。その結果、胎生15-17日のマウス大脳皮質に存在する神経細胞核を用いて効率よいクローンマウス作製系を確立することができた。またこの結果は、神経細胞の分化過程におけるゲノム情報の変化を示唆するものとなった。

胎生マウス大脳皮質には大きく2つの神経細胞のグループが存在する。大脳皮質脳室側には、増殖性のある未分化神経細胞が存在する(脳室細胞)。また表面側には、分化した神経細胞が皮質盤を形成している(皮質細胞)。この脳室細胞と皮質細胞の核を、除核したマウス卵に導入してクローンマウスの作製を行った。その結果、両核においてクローン胚が効率よく得られた。この得られたクローン胚の効率は、他の体細胞核を用いた結果よりも2-5倍高い効率であり、神経細胞核がクローンマウス胚作製に適したものであることが明らかとなった。また、未分化神経細胞である脳室細胞核では、クローンマウスが誕生し成体まで生育し、交配の能力も正常であった。この結果は、脳室神経細胞核はクローンマウス作製において最も適した核の1つであることが明らかとなった。一方、皮質細胞核ではクローンマウス胚(10.5 日胚)の数は効率よく得られるものの、胚に異常が認めら

れた。このクローンマウス胚では、頭部縮小、心臓肥大などが認められ、中でも神経管の形成に異常が認められた。この結果は、分化した神経細胞核での核内ゲノム情報の変換を示唆するものであった。しかし、この胎生 10.5 日まではクローンマウスが発生することより、分化神経細胞核のクローン細胞を樹立できる可能性が示唆される結果でもあり、来年度以降にクローン細胞の樹立を目指したいと考えている。

神経細胞核のゲノム情報の解析にクローンマウス作製技術が有効であることを示した本研究結果は、本研究グループの神経細胞・体細胞レベルでのゲノム構造変換の解析に大きな方向性を示すものである。

4) ゲノム構造変化の生理学的意味の解析

本研究では、クラスター型カドヘリンのゲノム構造の変換だけでなく、そのゲノム構造によりもたらされる機能を明らかにすることがもう1つの大きな目標である。本年度、このクラスター型カドヘリンのゲノム構造を変換させた遺伝子変換マウスの作製を試みた。その結果現在、3種の遺伝子変換マウスが得られ、マウス個体レベルでの機能の解析を開始している。これらの遺伝子変換マウスでは神経性の異常が認められており、クラスター型カドヘリンのゲノム構造が脳の発生や機能発現に関わっていることが示唆されてきている。来年度は、このゲノム機能についても新たな展開ができると期待している。

4. 研究実施体制

八木グループ

- ① グループ長:八木 健(大阪大学細胞生体工学センター・教授)
- ② 研究種目:クラスター型カドヘリンを中心としたゲノム構造と機能の解析

柳町グループ

- ① グループ長:柳町 隆造(ハワイ大学医学部・教授)
- ② 研究種目:神経細胞核を用いたクローン動物作製

慶應グループ

- ① グループ長:浅川 修一(慶應大学医学部・助手)
- ② 研究種目:ゲノムライブラリー作製によるゲノム構造の解析

生理研グループ(平成 13 年 12 月より)

- ① グループ長:先崎 浩次(生理学研究所・助手)
- ② 研究種目:遺伝子変換細胞、マウス作製

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Hamada S. & Yagi T.; The cadherin-related neuronal receptor (CNR) family: a novel diversified cadherin family at the synapse. **Neuroscience Res.** 41, 207-215. (2001)
- Yamazaki Y., Makino H., Hamaguchi-Hamada K., Hamada S., Sigino H., Kawase E., Miyata T., Ogawa M., Yanagimachi R., & Yagi T.; Assessment of the developmental totipotency of

neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98:1402-1406 (2001)

- Kawasaki T., Bekku Y., Suto F., Kitsukawa T., Taniguchi M., Nagats I., Nagatsu T., Itoh K., Yagi T. and Fujisawa H.; Requirement of neuropilin 1-mediated Sema3A signals in patterning of the sympathetic nervous system. *Development* 129, 671-680 (2002)

(2) 特許出願

なし