

「ゲノムの構造と機能」

平成12年度採択研究代表者

八木 健

(大阪大学大学院生命機能研究科 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

生後に獲得的機能をもたらすシステムとして免疫系と神経系が知られている。この両システムは、1) 多様化した細胞種から成り立っていること、2) 複雑な細胞間相互作用によるネットワークをもっていること、で共通な側面をもつ。免疫系では、多様化したイムノグロブリンやT細胞受容体遺伝子が、獲得的免疫反応や抗原記憶において重要な機能を果たしている。本研究では、神経系における多様化遺伝子群であるクラスター型カドヘリンに注目し、獲得的機能を含む脳機能形成をもたらす分子メカニズムを明らかにしたいと考えている。本研究では、これまでにFynチロシンリン酸化酵素結合能によるクラスター型カドヘリンを単離し、マウスやヒトゲノムにおける遺伝子クラスター構造、マウス大脳皮質形成過程での体細胞レベルでの遺伝的変異、クローンマウス作製による神経細胞核情報変化の可能性について報告してきた。本年度は、各脊椎動物種におけるクラスター型カドヘリンゲノム構造の解析が進み、脳進化を考える中で分子進化的にも興味深い遺伝子クラスターであることが明かとなった。また、マウス神経細胞におけるクラスター型カドヘリンの体細胞レベルでの遺伝的変異がDNAレベルでの変異である可能性が高く示されてきた。単一神経細胞核からのクローンマウス作製系が確立し、分化神経核での遺伝的変異解析が進むことが期待される。更に、クラスター型カドヘリンの遺伝子変換マウスも作製でき、脳神経系での生理学的意義が明らかになることが予想される。以上の展開により、脳機能形成と制御に関わるクラスター型カドヘリンのゲノム構造と機能との役割が明らかになり、新たな脳形成原理が明らかにある見込みである。

2. 研究実施内容

本研究では、獲得的機能をもつ脳機能形成と機能の分子メカニズムを明らかにする目的で、クラスター型カドヘリンのゲノム構造と機能に焦点を絞り解析を行っている。

1) 脊椎動物脳進化過程におけるクラスター型カドヘリンゲノム構造の解析。

脳神経系の獲得的機能は、管状神経系進化（脳進化）とともに役割が大きくなり、脳の高次機能を生み出したと考えられる。本研究では、脳神経系で発現するクラスター型カドヘリンのゲノム構造を比較解析することにより、脳進化との関連性を探るために、脊椎

動物脳進化過程におけるクラスター型カドヘリンゲノム構造の解析を行っている。本年度は、今までに明らかにしてきたマウスおよびヒトのクラスター型カドヘリンのゲノム構造をもとに、フグゲノムプロジェクトにおける解析を行い、フグゲノムに存在するクラスター型カドヘリンゲノムの構造の一部を明らかにした。その結果、マウスやヒトで確認されているCNR/プロトカドヘリンの遺伝子クラスターのうち、 γ 遺伝子クラスターが認められず、 α 遺伝子クラスターが2クラスター存在していた。この結果は、クラスター型カドヘリンのゲノム構造進化において、各遺伝子クラスターの遺伝子欠損や重複による分子進化を示唆するものであり興味深い。また、BACライブラリー選別とショットガン法による遺伝子配列決定により、ゼブラフィッシュの、CNR/プロトカドヘリン、 α 遺伝子クラスターのゲノム構造を完全に明らかにすることに成功した。この結果、 α 遺伝子クラスターにおける可変領域エクソンにおいて、脊椎動物種間で各動物種の遺伝子配列が均一と成る遺伝子の協調進化が認められた。この結果は、脊椎動物種ごとに異なる遺伝子配列が均一化された遺伝子クラスターとして分子進化していることを示しており、脊椎動物の脳が各種において大きく多様化していることを考えると興味深い分子進化パターンであった。また本年度、他のメダカ、ニワトリ、ラットのBACライブラリー作製とクラスター型カドヘリンの選別に成功している。

2) 神経細胞分化過程におけるクラスター型カドヘリンの遺伝的変異の解析。

脳機能における獲得的機能形成を考える中で、昨年度までに本研究で明らかにしてきたマウス大脳皮質形成過程におけるクラスター型カドヘリンの遺伝的変異蓄積は興味深い、よって本年度は、神経細胞分化過程におけるクラスター型カドヘリンの遺伝的変異がゲノムDNAの構造変換による可能性について解析を行った。ゲノムDNAにおいて遺伝的変換がおこる免疫系においては、DNAの2重鎖切断修復酵素が発現し、機能する中で遺伝子の体細胞レベルにおける多様性がおこることが知られている。本年度、これらDNA 2重鎖切断修復酵素が実際にマウス大脳皮質形成過程において、高く発現していることを明らかにした。また、このDNA 2重鎖切断修復を引き起こす酵素群が全てセットとして発現していることも明らかとなり、マウス大脳皮質形成過程におけるDNA 2重鎖切断修復反応系の存在が示唆された。実際別のグループにより、XRCC2, XRCC4, DNAリガーゼが、正常な神経細胞分化に必要であることが遺伝子欠損マウスの解析より示唆されている。これらの状況を踏まえ、本年度我々は、体細胞レベルでの遺伝的変異が認められたクラスター型カドヘリンのゲノムDNAでのDNA 2重鎖切断について解析した。その結果、興味深いことに、マウス大脳皮質においてDNA 2重鎖切断が高頻度で起っていることを明らかにした。この結果は、クラスター型カドヘリンの遺伝的変異がゲノムDNAの構造変換によって起っている可能性を強く示唆するものである。

3) マウス神経核クローンマウス作製による分化神経核情報変換機構の解析。

本研究では現在までに、マウス神経細胞核を用いたクローンマウス作製において、マウス正常発生をもたらす核の全能性が神経細胞分化過程において減少することを報告してきた。この分化神経細胞核における情報変換を明らかにすることを目的として、本年度は

成体マウス大脳皮質の大型錐体神経及び小脳プルキンエ細胞の神経核を除核卵に導入し、クローンマウス作製を行った。この神経核導入卵は、4細胞期までにほとんどの発生が止まってしまった。この核導入卵を用いて、神経核の染色体構造の解析を行った結果、染色体異常が頻度高く認められ、分化神経核では染色体レベルでの変換が起っている可能性を示唆した。

また本年度は、単一神経細胞レベルでの遺伝子発現調節システムを解明する目的で、神経細胞腫株におけるクラスター型カドヘリンの選択的遺伝子発現機構の解析を行った。その結果、染色体DNAのメチル化によるクラスター型カドヘリンの選択的遺伝子発現制御の可能性が明らかとなった。また、クラスター型カドヘリンの遺伝子変換マウス作製を行い、次年度以降でのクラスター型カドヘリンの生理学的意義の解析の準備を整えることができた。

3. 研究実施体制

八木グループ

- ① グループ長：八木 健（大阪大学大学院生命機能研究科・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

- ① グループ長：先崎 浩次（生理学研究所・助手、平成14年8月まで）
平林 敬浩（生理学研究所・助手、平成14年9月から）
- ② 研究種目：遺伝子変換細胞、マウス作製

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Osada T, Kusakabe H, Akutsu H, Yagi T, Yanagimachi R
Adult murine neurons: their chromatin and chromosome changes and failure to support embryonic development as revealed by nuclear transfer
Cytogenet. Genome Res. 97(1-2) 7-12 (2002)
- Kawasaki T, Bekku Y, Suto F, Kitsukawa T, Taniguchi M, Nagatsu I, Nagatsu T, Itoh K, Yagi T & Fujisawa H
Requirement of neuropilin 1-mediated Sema3A signals in patterning of the sympathetic nervous system.

Development 129, 671-680 (2002)

- Yagi T., Tada M., Tanaka Y., Senzaki K., Hirayama T., Hamada S., Sugino H.
Diversity of the cadherin-related neuronal receptor family in the nervous system
“Genome Science-Towards a New Paradigm?”: International Congress
Series1246:127-136 (2002)

- Takeshi Yagi
Diversity of the cadherin-related neuronal receptor /protocadherin family and possible DNA rearrangement in the brain.
Genes to Cells 8, 1-8 (2003)

- Taniguchi M, Nagao H, Takahashi Y, Yamaguchi M, Mitsui S, Yagi T, Mori K, & Shimizu T
Distorted Odor Maps in the Olfactory Bulb of Semaphorin 3A-Deficient Mice
The Journal of Neuroscience 23(4) (2003)

- Masuda T, Tsuji H, Taniguchi M, Yagi T, Tessier-Lavigne M, Fujisawa H, Okado N, Shiga T.
Differential non-target-derived repulsive signals play a critical role in shaping initial axonal growth of dorsal root ganglion neurons.
Developmental Biology 15;254(2):289-302 (2003)

- Hirabayashi M, Kato M, Ishikawa A, & Hochi S
Factors Influencing Chromosome Condensation and Development of Cloned Rat Embryos
Cloning and Stem Cells 5(1):35-42 (2003)

- Hirabayashi M, Kato M, Takeuchi A, Ishikawa A, & Hochi S
Factors Affecting Premature Chromosome Condensation of Cumulus Cell Nuclei Infected Into Rat Oocytes
Journal of Reproduction and Development 49(2):121-126 (2003)

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数 4 (CREST研究期間累積件数 8)