

「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ことが知られている。本研究では、ゲノム染色体上で遺伝子クラスターを形成し、脳神経系において発現する多様化遺伝子群、クラスター型カドヘリンに注目し、脳機能形成の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遺伝的変異の可能性、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、成体マウス大脳皮質よりゲノムDNAライブラリーを作製し、体細胞レベルでのCNR/ Pcdhのゲノム構造異常について解析した。その結果、CNR/Pcdh α v6のイントロンレスcDNA様断片が、ゲノムribosome DNAに挿入された脳神経におけるゲノムDNAが得られた。この挿入CNR/Pcdh α v6DNA領域にはもともとのCNR/Pcdh α v6の塩基配列とは異なる10個の遺伝的変異が認められた。この結果は、脳神経系の体細胞レベルにおいてCNR/Pcdhファミリーの変異DNAが合成されていることを示唆する。しかし、この変異DNA断片は一過的な異常であることより、必ず起こるプログラムされたものではないと考えられる。また本年度、CNR/ Pcdh α に細胞外カルシウム依存的な細胞接着活性があることを示すことができた。興味深いことに、この細胞接着活性は、カドヘリンで一般的に認められるホモフィリックな細胞接着活性ではなく、インテグリンとのヘテロフィリックな細胞接着活性であった。インテグリンは脳神経系において、神経細胞移動やシナプス可塑性での機能が報告されており、CNR/ Pcdh α との細胞接着活性の発見は、クラスター型カドヘリンのゲノム機能を探る上で興味深い。また、ラット、ニワトリ、Xenopus tropicalis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い、クラスター型カドヘリンのゲノム構造の分子進化の特徴を明らかにしてきた。以上、本年度は、脳神経系で認められた一過的ゲノム変換構造の解析、細胞接着活性をもたらす分子機能の解析、鳥類、両生類におけるクラスター

型カドヘリンのゲノム構造の解析、を新たに展開することができた。

2. 研究実施内容

本研究では、脳機能形成の分子メカニズムを明らかにする目的で、多様化したゲノム構造を持つ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) マウス脳神経系、体細胞レベルにおけるCNR/Pcdh α ゲノム構造の解析。

研究目的：本年度は、マウス脳神経系、体細胞におけるCNR/ Pcdh α ゲノムDNAレベルでの遺伝的変異を、マウス脳ゲノムDNAライブラリーの作製を行い解析した。

方法と結果：成体C57BL/6マウス脳のゲノムDNAよりゲノムライブラリーの作製を行い、CNR/Pcdh α 定常領域のプロンプを用いてスクリーニングした。その結果、11個のクローンが得られた。11クローンの内、10クローンは末端配列と挿入されたDNA断片の長さがゲノム構造による予想サイズと一致した。ところが、1クローンについては、末端配列がCNR/ Pcdh α ではなく、BLAST解析により、リボゾームDNA領域の配列であることが明らかとなった。そこで、このクローンについて全塩基配列の決定を行ったところ28S rDNA領域にCNR/Pcdh α v6が挿入されたDNA構造であることが明らかとなった。この挿入配列の5'側には、CNR/Pcdh α v6のプロモータ領域にあるTATA, CGCTモチーフを含んでいた。また、可変領域と定常領域がスプライシングされたイントロンレスの配列となっていた。この挿入されたDNA断片の両端には、rDNAやCNR/Pcdh α の配列にないTTGTT配列の付加が両端に認められた。更に、挿入されているCNR/Pcdh α のDNA領域には10個の点突然変異が認められ、内7個はタンパク質をコードする領域にあり、その内5個はアミノ酸配列変化を伴う非同義的置換であった。この結果は、CNR/Pcdh α のmRNAが逆転写され、イントロンレスのDNA構造をもち、rDNA領域に体細胞レベルで挿入されたことを予想させる。そこで、マウス脳においてこのイントロンレスDNAが生じているか否かについて、PCR法を用いて確かめた。生後1日目から8ヶ月令のマウス個体より、脳を取り出し、嗅球、大脳皮質、海馬、小脳に分ける。また、肝臓、心臓、腎臓、精巣についても摘出した。それぞれの組織よりゲノムDNAを調整して、抽出DNAに対し、イントロンレスDNAを増幅させるPCRを行った。その結果、27個体中9個体のマウスの脳組織でDNAの増幅が認められた。しかし、脳以外の組織ではDNAの増幅は全く認められなかった。この結果は、マウス脳体細胞のDNAレベルで、イントロンレスDNAが一過的に生み出されていることを示唆した。しかし、CNR/Pcdh α のイントロンレスDNAの増幅が認められた頻度は、1/3のマウス個体の脳であり、このDNAレベルでの変化は一過的な異常であると考えられる。

2) CNR/ Pcdh α の細胞接着活性についての解析。

細胞接着活性の測定で用いられるL細胞やNeuro2A細胞を用いた実験で、CNR/Pcdh α タンパク質は細胞膜表面にほとんど発現しない。よって今まで、CNR/Pcdh α の細胞接着活性については全く明らかにされていなかった。本年度は、HEK293T細胞株を用いてCNR1の細胞接着活性を明らかにすることができた。この細胞接着活性は、CNR1の第一

カドヘリンドメインにあるRGDモチーフによる活性であり、インテグリンとの細胞接着活性であった。インテグリンと結合するRGDモチーフは、多様化したCNR/Pcdh α のアイソフォーム間で、よく保存されており、クラスター型カドヘリンの分子機能を考える上でも興味深い。また、CNR/Pcdh α とインテグリンタンパク質は、シナプス結合部に局在していることが示唆されており、シナプス結合の多様化に関わる分子メカニズムに関与することが予想される。

3) 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。

研究目的：クラスター型カドヘリンであるCNR/Pcdhファミリーは、脊椎動物種でゲノム構造が多様化していることが示唆されている。本研究では、各種脊椎動物種におけるCNR/Pcdhファミリーのゲノム構造の解析を行っている。

結果：CNR/Pcdh α の可変領域エクソンV α は、マウスで12、ヒトで13個あることがわかっている。Long Evanceラットの解析をした結果、ヒトと同じ13個のエクソンがあることが明らかとなった。マウスとラットでの比較をしたところ、ラットのV α 8のエクソンがマウスでは、レトロトランスポゾンにより偽遺伝子となっていることが明らかとなった。また、プロモータ領域のCGCT配列、エクソン領域の高頻度CpGアイランド、第一カドヘリン領域のRGD配列、細胞膜直下のシステイン残基の繰り返し構造、細胞内共通領域のPXXPモチーフは、ラットにおいてもよく保存されていた。ラットは、脳機能解析に関する行動学、生理学、薬理学の解析によく用いられるモデル動物であり、ラットを用いたCNR/Pcdhファミリーの解析が可能となった。

鳥類であるニワトリのCNR/Pcdh α のゲノム構造の解析を行った。可変領域エクソン数は12個であり、マウス及びヒトとの相同性は50-60%であった。また、可変領域エクソンのV α とV c の間のイントロン領域が、ニワトリでは哺乳動物に比べ極端に短いことが明らかとなった。プロモータ領域のCGCT配列、エクソン領域の高頻度CpGアイランド、細胞内共通領域のPXXPモチーフ、定常領域の配列はよく保存されていたものの、第一カドヘリン領域のRGD配列については全く保存性がなかった。RGD配列が、インテグリンとの細胞接着活性に関わる結果を考える中で、鳥類とほ乳類で、CNR/Pcdh α の相互作用する分子機能が異なることが想定される。また、可変領域エクソンについて系統樹を描いたところ、ニワトリの可変領域エクソンはヒト、マウス、ラットと異なる枝に連なっており、ニワトリの可変領域エクソン間での相同性が高いことが明らかとなった。この結果は、ニワトリの遺伝子クラスターでは、ほ乳類と異なる遺伝子配列の均一化がおこり、塩基配列変異における協調進化が起こってきたことが示唆された。

カエル (*Xenopus tropicalis*) についても、BACライブラリーが完成して、CNR/Pcdhファミリーのゲノム領域のスクリーニングを行った。その結果、Pcdh γ のゲノム領域を含むBACが得られ塩基配列が明らかになり、その一部の塩基配列決定を行ったところPcdh γ c5の配列が得られた。

3. 研究実施体制

八木グループ

- ① 研究分担グループ長：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 研究分担グループ長：山崎 由紀子（ハワイ大学医学部・Assistant Researcher）
- 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 研究分担グループ長：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 研究分担グループ長：平林 敬浩（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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Sugino H, Yanase H, Hamada S, Kurokawa K, Asakawa S, Shimizu N & Yagi T : Distinct genomic sequence of the CNR/Pcdh α genes in chicken ; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316:437-445 (2004)
- Kato M, Ishikawa A, Hochi S, and Hirabayashi M : Effect of Activation Regimens for Rat Oocytes on Full-term Development Following Round Spermatid Injection ; *Contemporary Topics Laboratory Animal Science*, 43(2):13-15 (2004)
- Kato M, IshikawabA, Hochi S and Hirabayashi M : Donor and Recipient Rat Strains Affect Full-Term Development of One-Cell Zygotes Cultured to Morulae / Blastocysts ; *The Journal of Reproduction and Development*, 50(2):191-195 (2004)
- Ishi Y, Asakawa S, Taguchi Y, Ishibashi S, Yagi T & Shimizu N. : Construction of BAC library for the amphibian, *Xenopus tropicalis* ; *Genes & Genetic Systems*, 79(1):49-51(2004)
- Yuasa S, Hattori K, & Yagi T : Defective neocortical development in Fyn-tyrosine-kinase-deficient mice ; *Neuro Report* , 15(5):819-822 (2004)
- Mutoh T , Hamada S, & Yagi T: Cadherin-related Neuronal Receptor 1(CNR1)

has cell-adhesion activity with $\beta 1$ integrin mediated through the RGD site of CNR1; *Experimental Cell Research*, 294:494-508(2004)

- Yanase H, Sugino H, and Yagi T: Genomic sequence and organization of the family of *CNR /Pcdha* genes in Rat; *Genomics*, 83(4):717-726 (2004)
- Sugino H, Miyazaki M, & Yagi T : Intron-less processed cadherin-related neuronal receptor (CNR/Pcdha) genes in the central nervous system ;*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313:775-783 (2004)
- Hamaguchi-Hamada K, Sanbo C, Hamada S, Yagi T : E x p o s u r e t o hexanal odor influences maternal behavior and induces neonatal death in Fyn tyrosine kinase-deficient mice; *Neurosci. Res.*, 48:259-267 (2003)
- Nakahara J, Tan-Takeuchi K, Seiwa C, Gotoh M, Kaifu T, Ujike A, Inui M, Yagi T, Ogawa M, Aiso S, Takai T, & Asou H: 「Signaling via Immunoglobulin Fc Receptors Induces Oligodendrocyte Precursor Cell Differentiation」 ; *Developmental Cell* 4, 841-852 (2003)
- Cowen MS, Schumann G, Yagi T, Spanagel R. : Role of Fyn tyrosine kinase in ethanol consumption by mice. *Alcohol Clin Exp Res.*, 27(8): 1213-1239 (2003)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）