

「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と機能の解析」

1. 研究実施の概要

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る。脳神経系において、多様化した神経細胞種を生み出すゲノム情報や遺伝的制御を明らかにする目的で、脳神経系で発現する多様化受容体型分子群であるクラスター型カドヘリンのCNR/プロトカドヘリンに注目して研究を進めてきた。本研究により、CNR/プロトカドヘリンは様々な脊椎動物種で遺伝子クラスターを構成していることが明らかになった。この遺伝子クラスター構造は、動物種間において多様性を持ち種特異的な遺伝子クラスター構造や配列が認められた。また、同一動物種集団においても遺伝的多型を高度に有しており、遺伝子産物の構造や配列における多様化が認められた。遺伝子クラスターにある可変領域では、遺伝子変換、ゲノム配列均一化、GC含量の不均一化などの分子進化が明らかとなり、分子進化が一定の方向性をもっていることをあきらかにすることができた。多様化したCNR/プロトカドヘリン α 各アイソフォームは、単一神経細胞において別々の組み合わせで発現しており、神経細胞ごとの多様性をもたらしている可能性が示唆されている。本年度、単一神経細胞での各染色体レベルでの遺伝子制御を解析した結果、各 α アイソフォームの発現は、染色体ごとに独立して制御されていることが明らかとなった。この染色体レベルでの遺伝子制御は今までに知られている遺伝子制御とは異なる新しいタイプのものであることが明らかになった。また、別々の遺伝子クラスターにコードされるプロトカドヘリン α と γ がタンパク質レベルで複合体を形成し、細胞膜に移行すること、 α アイソフォームとインテグリンとの相互作用により細胞接着活性がもたらされていることも明らかにした。以上、本研究によりCNR/プロトカドヘリンのゲノム構造の多様性、機能的タンパク質の多様性が明らかになった。また、独自の遺伝子発現制御によりCNR/プロトカドヘリン分子群の遺伝的多様性が神経細胞レベルでの多様性を生み出している可能性が示唆された。

2. 研究実施内容

1) クラスター型カドヘリンのゲノム構造の解析

本研究では、クラスター型カドヘリンの遺伝的多様性の意義を探る目的で、ゲノム構造を、魚類 (Tada et al, 2004)、両生類 (Ishii et al, 2004)、鳥類 (Sugino et

al., 2004)、マウス (Taguchi et al, 2005)、ラット (Yanase et al, 2004)、ヒト (Miki et al, 2005) において明らかにした。ゼブラフィッシュでは β 遺伝子クラスターが存在せず α 、 γ の遺伝子クラスターが2セット存在していることが明らかとなり、脊椎動物種での遺伝子クラスターごとの分子進化が明らかとなった。また、CNR/プロトカドヘリン遺伝子クラスターにおいて、遺伝子変換、GC含量の不均一化、同一種内での遺伝子配列均一化が起っていることを明らかとし、遺伝的多型、分子進化の方向性を明らかにした (Taguchi et al, 2005)。また、ヒト集団でのCNR/プロトカドヘリンの遺伝的多型が高頻度で確認され、遺伝子変換、アミノ酸配列置換を伴うメジャーハプロタイプの存在を明らかにした (Miki et al, 2005)。

2) クラスター型カドヘリンのゲノム構造変換の解析

免疫系では、多様化膜分子群のゲノム再構成が知られている。本研究では神経細胞核クローンマウス作製とCNR/プロトカドヘリンに注目して、脳神経系におけるゲノム再構成についての解析をすすめてきた。その結果、脳組織において変異を受けたCNR/プロトカドヘリンDNA領域を得ることができたが、一過的なものであることが示唆された (Sugino et al, 2004)。また、核移植を用いたクローンマウス胚作製において、分化神経細胞核ではクローンマウス胚が胎生中期において高頻度で異常となることを改めて確認した (Makino et al, 2005)。神経細胞分化過程における核情報変換の可能性が強く示唆された。現在、クローンマウス胚から得たES細胞株による核情報解析を進行している。

3) クラスター型カドヘリンタンパク質の発現機能解析

CNR/プロトカドヘリン α タンパク質は、培養細胞株において強制発現させても細胞膜に発現せず、膜タンパク質機能解析が困難であった。CNR/プロトカドヘリン α タンパク質を一部細胞膜で発現するHEK293細胞株を用いて、タンパク質機能を解析したところ、インテグリンとの細胞接着能を明らかにすることができた (Mutoh et al, 2004)。また、細胞膜での発現が困難であったCNR/プロトカドヘリン α をプロトカドヘリン γ との組み合わせで発現させると、細胞膜への発現の誘導がおこることを発見した (図1)。この結果、 α γ タンパク質複合体が細胞膜での機能分子単位であることが想定された (Murata et al, 2004)。

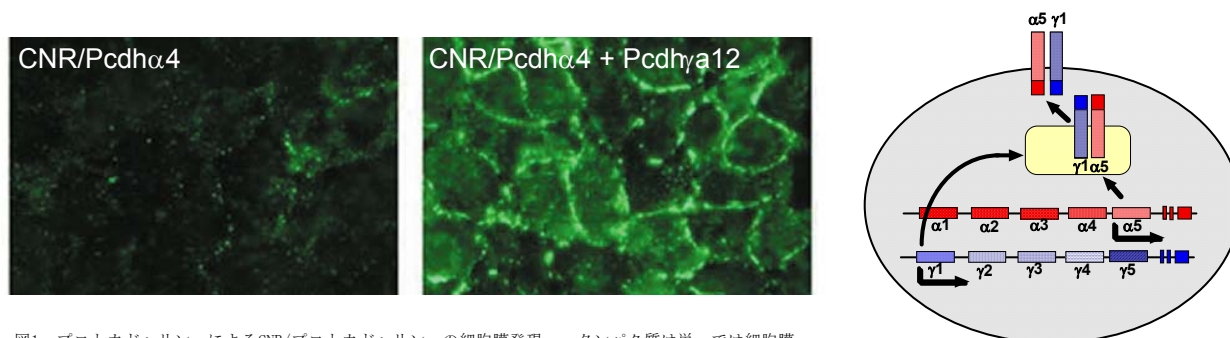


図1 プロトカドヘリン γ によるCNR/プロトカドヘリン α の細胞膜発現。 α タンパク質は単一では細胞膜に発現しにくい、 γ タンパク質との共発現により細胞膜への移行が認められる。右図は、その模式図。

4) クラスター型カドヘリンの発現解析

マウス大脳皮質発生過程でのCNR/プロトカドヘリン α タンパク質の発現を明らかにした (Morishita et al, 2004a)。また、CNR/プロトカドヘリン α が神経回路形成に依存して発現制御を受けており、ミエリン形成不全により発現変化が起こることが明らかとなった (Morishita et al, 2004b)。また、マウス小脳プルキンエ細胞を用いた単一神経細胞レベルでのアイソフォーム発現解析の結果、 α アイソフォーム発現は単一神経細胞において各染色体レベルで独立して遺伝子制御されているが、両方の染色体が使われ複数のアイソフォームを発現していることが明らかとなった (図2)。今までの多様化膜分子群の発現制御では、対立遺伝子発現排除が知られており、同一細胞において片方の染色体のみが遺伝子発現に使われることが知られている。よって、本研究で明らかとなったCNR/プロトカドヘリン α アイソフォームの遺伝子発現は、単一神経細胞における新たな染色体レベルでの遺伝子制御機構を示唆するものであった。またこの遺伝子制御は、X染色体不活性化、ゲノムインプリンティングにおける染色体レベルでの遺伝子発現制御メカニズムとも異なり、全く新しい制御機構であることが示唆された。本研究により、脳神経系における新たな神経細胞多様化機構が示唆された (Esumi et al., 2005)。

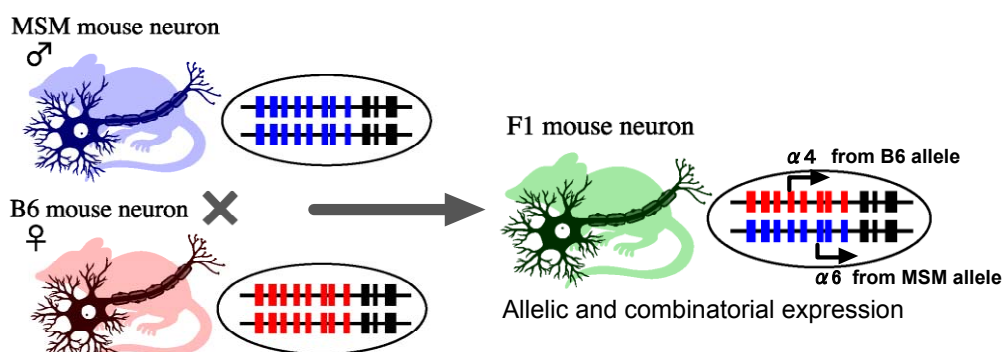


図2. C57BL/6 (B6)とMSMのF1マウスを用いた遺伝子発現解析。単一神経細胞において複数のアイソフォームが発現し、染色体レベルでの新しい遺伝子制御が確認された。単一プルキンエ細胞では、 α アイソフォームが複数の種類発現し、各アイソフォームは別々の染色体に由来していた。図では $\alpha 4$ がB6、 $\alpha 6$ がMSM染色体に由来している。

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 研究項目：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

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 研究項目：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 研究項目：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

- Hirabayashi M, Kato M, Ishikawa A, Kaneko R, Yagi T & Hochi S. : Factors affecting production of transgenic rats by ICSI-mediated DNA transfer: Effects of sonication and freeze-thawing of spermatozoa, rat strains for sperm and oocyte donors, and different constructs of exogenous DNA. : **Mol Reprod Dev.** ; Apr;70(4):422-8. (2005)
- Ohsawa S, Hamada S, Kakinuma Y, Yagi T, & Miura M. : Novel function of neuronal PAS domain protein 1 in erythropoietin expression in neuronal cells. : **J Neurosci Res.** ; 79:451-458 (2005)
- Esumi S, Kakazu N, Taguchi Y, Hirayama T, Sasaki A, Hirabayashi T, Koide T, Kitsukawa T, Hamada S & Yagi T. : Monoallelic yet combinatorial expression of variable exons of the CNR/Protocadherin- α gene cluster in single neurons. : **Nature Genet.** ; 37(2):171-176 (2005)
- Kettunen P, Loes, S, Furmanek T, Field K, Kvinnsland IH, Behar O, Yagi T, Fujisawa H, Vainio S, Taguchi M & Luukko K. : Coordination of trigeminal axon navigation and patterning with tooth organ formation: epithelial-mesenchymal interactions, and epithelial Wnt4 and Tgfbeta1 regulate semaphorin 3a expression in the dental mesenchyme. : **Development** ; 132(2):323-34. (2005)
- Morishita H, Kawaguchi M, Murata Y, Seiwa C, Hamada S, Asou H & Yagi T. : Myelination triggers local loss of axonal CNR/Protocadherin α family protein expression. : **Eur. J, Neurosci.** ; 20:2843-2847 (2004)
- Morishita H, Murata Y, Esumi S, Hamada S & Yagi T. : CNR/Pcdh α family in subplate neurons, and developing cortical connectivity. : **Neuroreport** ; 15(17):2595-2599 (2004)
- Hamaguchi-Hamada K, Hamada S & Yagi T. : Exposure to hexanal odor induces extraordinary Fos expression in the medial preoptic area and amygdala of Fyn tyrosine kinase-deficient mice. : **Mol. Brain Res.** 130(1-2):187-190 (2004)
- Kato M, Ishikawa A, Kaneko R, Yagi T, Hochi S, Hirabayashi M. : Production of transgenic rats by ooplasmic injection of spermatogenic cells exposed to exogenous DNA: a preliminary study. : **Mol Reprod Dev.** ;69(2):153-158. (2004)
- Tada T, Senzaki K, Tai Y, Morishita H, Tanaka Y, Murata Y, Ishii Y, Asakawa

- S, Shimizu N, Sugino H & Yagi T. : Genomic organization and transcripts of the zebrafish Protocadherin genes. : **Gene** ; 340:197-211 (2004)
- Kubota O, Hattori K, Hashimoto K, Yagi T., Sato T, Iyo M & Yuasa S. : Auditory-conditioned-fear-dependent c-Fos expression is altered in the emotion-related brain structures of Fyn-deficient mice. : **Mol. Brain Res.** 130:149-160 (2004)
- Murata Y, Hamada S, Morishita H, Mutoh T & Yagi T.: Interaction with Protocadherin- γ regulates the cell-surface expression of Protocadherin- α . : **J. Biol. Chem.** ; 279(47):49508-49516 (2004)
- Abe M, Fukuya M, Yagi T., Mishina M, Watanabe M & Sakimura K. : NMDA Receptor GluR ϵ /NR2 Subunits Are Essential for Postsynaptic Localization and Protein Stability of GluR ζ 1/NR1 Subunit : **J. Neurosci.** ; 24(33):7292-7304 (2004)
- Sugino H, Toyama T, Taguchi Y, Esumi S, Miyazaki M, Yagi T. : Negative and positive effects of an IAP-LTR on nearby Pcdalpha gene expression in the central nervous system and neuroblastoma cell lines. **Gene** ; 4 (337) 91-103.
- 服部功太郎、八木健 : Reelinと統合失調症 : Schizophrenia Frontier vol.5 No.3
- (2) 特許出願
H16年度特許出願件数 : 1 件 (CREST研究期間累積件数 : 2 件)