

大阪大学大学院生命機能研究科  
教授

八木 健

「クラスター型カドヘリンの  
ゲノム構造・機能の解析」

研究期間：平成12年11月～平成18年3月

## 1. 研究実施の概要

脳神経系は複雑なシステムであり、多様な細胞種により構成されている。この複雑な脳神経系において、これを構成する個々の神経細胞がどの様に多様化、特殊化し、神経回路形成、組織化し、秩序ある機能をもたらしているのか。私たちは、脳神経系にある多様性の分子的基盤を理解して行くことが、以上の質問に答える大きな一歩になると考えている。実際、脳神経系と類似した免疫系では、多様化膜分子群のゲノム再構成による細胞多様化機構がシステムの分子的基盤となり、適応免疫や免疫記憶をもたらしている。そこで本研究では、脳神経系で発現している多様化膜分子群に注目し、脳神経系における多様性の分子的基盤の解析を行った。CNR/プロトカドヘリンは、1998年に Fyn チロシンリン酸化酵素との結合活性を指標に単離・同定された多様化膜分子群であり、脳神経系で発現することが明らかとなっている。また、この CNR/プロトカドヘリンはゲノム染色体において遺伝子クラスターを形成しており、この遺伝子クラスター構造が免疫系における多様化膜分子群、T細胞受容体やイムノグロブリン遺伝子クラスターと類似し、「可変領域」と「定常領域」より構成されている。本研究では、この CNR/プロトカドヘリンをクラスター型カドヘリンとして位置づけ、脳神経系における多様性の分子的基盤を、ゲノム構造と機能の観点より解析した。

また本研究では、単一神経細胞にあるゲノム情報を解析する新たな技術の導入を試みた。その一つが 1998年に確立されたクローンマウス作製法であり、クローンマウス作製法を世界で初めて神経細胞核に応用することができた。また、多様化したゲノム構造を解析する中では、BACライブラリー作製技術とシーケンス解析システムが必要であると考え、導入し種々の脊椎動物の CNR/プロトカドヘリンのゲノム構造を明らかにした。この様に本研究プロジェクトでは、脳における多様性の分子的基盤を解析する中で、クローンマウス作製技術、ゲノム解析技術、遺伝子変換マウス作製技術を融合的に導入して、研究を推進した。

本研究においては、脳における単一神経細胞のゲノム情報を解析する新たな方法が必要であると考え、除核未受精卵に神経細胞核移植を行なうクローンマウス胚作製法を用いて解析を行った。その結果、以下の研究成果を明らかにすることができた。

- 1) 神経細胞核を用いたクローンマウス胚作製において、未分化神経細胞核を用いた場合には正常クローンマウスが誕生した。他の体細胞核クローンマウスの結果と比較しても、高率に誕生が認められた。
- 2) 分化神経細胞核を用いたクローンマウス作製では、正常なクローンマウス誕生はほとんど認められなかった。胎生 10 日のクローンマウス胚を観察した結果、ほとんどのクローンマウス胚に形態異常が認められ、神経管形成異常が顕著に認められた。
- 3) 生後 0 から 10 日のマウス大脳皮質にある分化神経細胞核を用いたクローンマウス胚作製においても、2) で認められた胎生 10 日クローンマウス胚での発生異常、神経管形成異常が認められた。このことより、神経細胞の分化過程における核情報変換の可能性が示唆された。
- 4) 大脳皮質にある分化神経細胞核を用いた核移植後、クローン胚より ES 細胞株を樹立することに成功した。この分化神経細胞核クローン ES 細胞を用いて、キメラマウス作製、核移植を用いたクローンマウス作製を行った結果、正常クローンマウスが誕生することが明らかとなった。この結果、分化神経細胞核においても可逆的な多分化能が認められた。

- 5) クローン ES 細胞株を樹立することにより、分化神経細胞核においてもリプログラミングがおこり正常発生することが明らかとなった。しかし、ES 細胞を介さないリプログラミングは不十分であることが示唆され、神経細胞分化過程におけるゲノム情報変換機構がおこっている可能性を示唆した。

体細胞レベルでの CNR/プロトカドヘリンの遺伝子変換についての解析では、RT-PCR 法を用いた解析により脳発生・発達過程での CNR3 転写産物における塩基置換蓄積の可能性が示唆された。しかし、人工的なエラーを除去するために PCR 法を用いない塩基置換の解析を行ったところ、生後 1 日のマウス大脳皮質でのみ CNR/プロトカドヘリンの塩基置換の可能性が示唆された。しかし、この生後 1 日以外での塩基置換の蓄積は確認できず、この塩基置換の意義については不明であった。また、マウス脳ゲノム DNA ライブラリーより可変領域と定常領域が繋がった CNR/プロトカドヘリン cDNA 様のゲノム DNA が得られた。このゲノムは、リボソーム DNA 領域にプロモーター領域と塩基置換を含む CNR/プロトカドヘリン cDNA 様が挿入された構造であった。最近、Gage 博士のグループより、神経細胞分化に伴う LINE のレトロトランスポジションによる一過的なゲノム変換が報告された。本研究で得られた異常な CNR/プロトカドヘリン cDNA 様ゲノム DNA も、この過程でつくられたものである可能性が示唆された。しかし、神経細胞の CNR/プロトカドヘリンにおいては、免疫細胞のような全ての分化細胞でプログラムされたゲノム再編成は認められず、ゲノム DNA レベルでの遺伝子変換機構はあっても一過的なものであり、神経細胞の機能的意義についても不明であった。

脳神経系において、個々の神経細胞の多様化機構が示唆されている。そこで本研究では、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ と個々の神経細胞の多様化機構との関連性について解析を行った。その結果、

- 1) 単一神経細胞レベルでのアイソフォーム発現解析系を、マウス小脳プルキンエ細胞を用いた分注 PCR 法を用いて確立した。
- 2) CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 分子群の各アイソフォームが、単一神経細胞において異なる組み合わせで発現しており、単一神経細胞ごとに異なる遺伝子発現をしていることが明らかとなった。
- 3) 単一神経細胞における CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 分子群の各アイソフォームの発現様式を C57BL/6 と MSM マウスを交配した F1 マウスの小脳プルキンエ細胞を用いて行った。その結果、単一神経細胞において $\alpha$ アイソフォームの多くが片方の染色体のみに由来していた。 $\alpha$ アイソフォーム発現では、各染色体レベルでの独立した遺伝子制御が示唆された。
- 4) 本研究で明らかとなった CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ アイソフォームの遺伝子発現は、今までに知られている対立遺伝子発現排除、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異なり、脳神経系における新たな神経細胞の多様化機構であると考えられる。
- 5) プロトカドヘリン $\gamma$ による CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ タンパク質の細胞膜への誘導を明らかにした。この結果は、 $\alpha$  $\gamma$ 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、組み合わせによるタンパク質機能の多様化が示唆された。
- 6) HEK293 細胞株を用いて CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ タンパク質がインテグリンと相互作用し、細胞接着能を示すことを明らかにした。

7) CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ タンパク質の第1カドヘリン領域のタンパク質構造をNMRにより明らかにした。

また、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ の脳神経系における機能的役割の解析を、発現解析と遺伝子変換マウス作製による解析により行った。その結果、

- 1) マウス大脳皮質発生過程において、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ が神経細胞分化過程において発現し、サブプレートニューロンにおいても発現が認められた。
- 2) CNR/プロトカドヘリンは神経回路形成過程で発現が高まり、回路成熟過程で発現の減少が認められた。この発現減少には神経軸索へのミエリン形成が関与することが明らかとなった。
- 3) 遺伝子変換マウス作製により、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ が神経回路形成、情動行動制御、学習・記憶に関わることが明らかになった。
- 4) CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ と結合活性をもつFynチロシンリン酸化酵素は、ドーパミン受容体の下流でNMDA受容体の機能を制御していた。
- 5) Fynとヒト統合失調症との関連性が示唆された。

また、本研究では脳の進化、脳機能の多様性を理解するための分子的基盤としてCNR/プロトカドヘリンに注目し、魚類、両生類、鳥類、齧歯類、霊長類、ヒト、イルカのCNR/プロトカドヘリンのゲノム構造を解析し、比較検討した。研究成果としては、

- 1) ゼブラフィッシュのCNR/プロトカドヘリンの遺伝子クラスター構造を明らかにした。その結果、 $\beta$ 遺伝子クラスターが存在せず $\alpha$ 、 $\gamma$ 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可変領域エクソンでは同一種内での遺伝子配列均一化が顕著に起こっていることが明らかとなった。
- 2) ニワトリのCNR/プロトカドヘリン $\alpha$ の遺伝子クラスター構造を明らかにした。その結果、非常に相同性の高いニワトリ特有の配列を有しており、同一種内での遺伝子配列均一化が顕著に起こっていた。
- 3) ゼノパストロピカリスのBACライブラリーを作製してCNR/プロトカドヘリンの遺伝子クラスター構造の一部を明らかにした。その結果、魚類、ほ乳類と異なる両生類に特有のゲノム構造が明らかとなった。
- 4) ラットCNR/プロトカドヘリンの遺伝子クラスター構造を明らかにした。マウスと比較することにより、齧歯類での分子進化を明らかにすることができた。
- 5) メダカのCNR/プロトカドヘリンの遺伝子クラスター構造を明らかにした。その結果、同じ魚類であってもゼブラフィッシュとはクラスター構造が異なること、同種で特徴的な配列の分子進化をしていることが認められた。
- 6) 野生マウス系統12種、ラボマウス系統4種の遺伝的多型の解析を行った結果、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。
- 7) ヒトにおけるCNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 、 $\beta$ クラスターにおける遺伝的多型の解析を行った。その結果、いずれのクラスターにおいても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、遺伝子欠損アレルが明らかとなった。また、この解析により、遺伝的多型頻度が極めて高いカドヘリン領域

も明らかとなり、ヒトでの遺伝的多様性の方向性を捉えることができた。これらの結果は、ヒト脳機能の多様性、脳機能疾患との関連性を考えて行く上で興味深い。

以上、本研究により、1)神経細胞の分化過程での新たなゲノム情報変換機構の可能性、2)単一神経細胞レベルでの多様化機構と CNR/プロトカドヘリン発現制御との関連性、3)CNR/プロトカドヘリンの脳の形成と機能制御におけるゲノム機能、4)脊椎動物における管状神経系、脳の進化における CNR/プロトカドヘリンのゲノム構造の進化、5)CNR/プロトカドヘリンのゲノム構造の分子進化、多様化の方向性、を明らかにすることができた。今後は、これらの研究成果をもとに、脳の多様性、脳機能の分子的基盤の解析が進められて行くことが考えられる。これらの研究成果の結果、ヒト脳機能の分子的基盤が明らかとなり、ヒト精神神経疾患の理解、ヒトの発達の理解、ヒトの多様性の理解が進むことが期待できる。

## 2. 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

本研究では、脳神経系で発現している多様化膜分子群に注目し、脳神経系における多様性の分子的基盤の解析を行なうことを目標に、クラスター型カドヘリンに注目してゲノム構造と機能の解析を行なう構想を申請した。その構想の中には、単一神経細胞のゲノム情報を解析する為の新しいクローンマウス作製技術の導入(ハワイ大学)、ゲノム BAC ライブラリー作製とシーケンス解析技術の導入(慶應義塾大学)、ゲノム機能解析の為の遺伝子変換マウス作製と解析技術(生理学研究所)が盛り込まれた。また、本研究の開始時には、脳神経系においても免疫系と同様なゲノム DNA 切断、連結、修復する酵素群が必要であるとの研究結果が報告され、神経細胞分化過程における体細胞レベルでのゲノム DNA 構造変化の可能性が示唆されていた。また本研究で注目した CNR/プロトカドヘリンは、ゲノムにおいて遺伝子クラスター構造を形成している多様化分子群であり、その遺伝子クラスター構造が免疫系の多様化膜分子群である T 細胞受容体やイムノグロブリンの遺伝子クラスターと類似した「可変領域」と「定常領域」から構成されることより、CNR/プロトカドヘリン遺伝子クラスターにおける体細胞レベルでのゲノム DNA 変換の可能性の追求を行った。

神経細胞は分化すると細胞増殖が止まるため、クローン化されたゲノム情報を解析することが難しい。また、免疫細胞の多様性に関わる細胞受容体やイムノグロブリンは、細胞ごとに異なった遺伝子組み換えがクローナルに起こり細胞の多様性を生み出していることが知られていることより、何らかの方法で分化した神経細胞核を丸ごとクローン化する方法を検討した。幸いにも、ハワイ大学医学部の山崎由紀子博士が、マウス体細胞核を用いたクローンマウス作製法を確立しており、柳町隆造博士の賛同も得られたので、ハワイ大学グループで神経細胞核を用いたクローンマウス作製を行った。

マウス大脳皮質の神経細胞核を用いたクローンマウス作製を行った結果、未分化状態の神経細胞核を用いた場合、クローンマウス胚が正常に発生し、クローンマウスが誕生した。また、このクローンマウスは交配可能であり、クローンマウス作製効率も他の体細胞よりも高率な結果であった(Yamazaki et al. 2001)。ところが、分化した神経細胞核を用いてクローンマウス作製した結果、ほとんどのクローンマウス胚が胎生 10 日で神経管形成異常が顕著に認められた。また、この分化した神経細胞核による

クローンマウス胚の異常は生後 0 から 10 日までの分化神経細胞核でも確認され、神経管形成異常が顕著に確認された (Makino et al. 2005)。また、成体マウス脳での神経細胞核では染色体異常が高頻度で確認された。一方、世界的には 2002 年、体細胞レベルで DNA 組み換えを起こしている T 細胞核、B 細胞核でも、ES 細胞株を介することによるクローンマウス作製の成功が報告され、T 細胞及び B 細胞核のマウス個体に発生する能力が証明された。また 2004 年には、嗅神経細胞核を用いた核移植によるクローン ES 細胞株の樹立により、クローンマウス作製の成功が報告され、分化した嗅神経細胞核についてもマウス個体に発生する能力が証明された。これらの結果により、分化した T 細胞、B 細胞、嗅神経細胞核には、マウス個体に発生する能力があり、ES 細胞株を介することで、この核の全能性が証明された。これらの状況の中、本研究における分化した神経細胞核によるクローンマウス胚の異常がゲノム DNA レベルの問題であるのか、神経細胞核のリプログラミングの問題であるのかを明らかにするために、クローン ES 細胞株の樹立を三菱生命研グループと共同で行った。Cre-loxP 系を用いて分化した神経細胞でのみ GFP 陽性となるトランスジェニックマウスを用いてマウス大脳皮質にある分化神経細胞クローン胚を作製し、この胚盤胞より ES 細胞株を樹立して、クローン核由来のキメラマウス作製、クローンマウス作製を行った。その結果、分化した神経細胞核であっても ES 細胞株を介することで、マウス個体に発生する能力があることが明らかとなった (Osada et al. 2005)。この様に、クローンマウス作製による体細胞核の解析が世界的に行われる中、マウス大脳皮質にある分化した中枢神経細胞核の解析については本研究グループによる解析が世界をリードした。その結果、通常のクローンマウス作製技術では、神経細胞の分化過程で核情報が変換し、異常なクローンマウス胚となってしまうが、この核情報の変換は ES 細胞株樹立によりリプログラミングされる可能性を示唆した。この神経細胞の分化過程で起こる核情報の変換機構は興味深いものがあり、エピジェネティックなゲノム変換機構の可能性を含めて今後検討する必要がある。この分化過程では、個々の神経細胞が特殊化する分子機構が想定されており、神経細胞の多様性獲得を考える中で興味深い解析系になると考えられる。

また本研究では、CNR/プロトカドヘリンの転写産物における遺伝子変換機構の可能性を追求した。マウス大脳皮質を用いた RT-PCR 法による解析により、CNR3 転写産物における塩基置換の蓄積の可能性を示唆した (Hirayama et al. 2001)。しかし、PCR エラーを回避した方法により CNR/プロトカドヘリン転写産物の解析を行った結果、生後 1 日では有意に塩基置換の可能性が示唆されたが、他の発生段階では全く塩基置換が認められなかった。この有意な塩基置換では、G から A への偏りがあるなどの特徴が認められたが、意義については不明である (Hirayama et al. 2005)。また、マウス脳ゲノム DNA ライブラリーより可変領域と定常領域が繋がったイントロンレス cDNA 様のゲノム DNA が得られており、この配列にはプロモーター領域が含まれ、塩基置換も認められた。2005 年、Gage 博士のグループより、神経細胞分化に伴う LINE のレトロトランスポジションが報告され、神経細胞の分化過程では一過的にゲノム変換が起こる可能性が示唆されている。また、この様な遺伝子変換には脳神経系での逆転写反応による cDNA 化と塩基置換、遺伝子挿入がおこる。この転写反応による cDNA 化と塩基置換では G から A への偏りが知られており、CNR/プロトカドヘリンの塩基置換における LINE レトロトランスポジションの可能性が示唆された。しかし、CNR/プロトカドヘリンで認められた塩基置換は低レベルであり、免疫系で認められた様な免疫細胞の多様性獲得機構の原理になる様なものではないと考えている。では、CNR/プロトカドヘリンの多

様性とはどのようなもので、神経細胞の多様性、脳神経系の機能にどの様に関わっているのでしょうか？本研究では、CNR/プロトカドヘリンの遺伝的多様性についてのゲノム構造と機能についての解析を推進した。

脳神経系は多様化した神経細胞から構成されており、神経細胞多様化に関わる分子メカニズムの存在が想定されている。そこで本研究では、CNR/プロトカドヘリンの単一神経細胞における遺伝子発現パターンの解析を行った。マウス小脳プルキンエ細胞は、mRNA 量が多く単一神経細胞レベルでのアイソフォーム発現解析を安定して行うことが可能である。この系を用いて分注 PCR 法を用いて解析を行った結果、CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  分子群の各アイソフォームが、単一神経細胞において組み合わせを持った差次的発現をしていることが明らかになった。本研究では更に、単一神経細胞における CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  分子群の各アイソフォームの発現パターンを C57BL/6(B6) と MSM マウス系統の F1 マウス小脳プルキンエ細胞を用いて、染色体レベルで解析した。その結果、単一神経細胞において  $\alpha$  アイソフォームは複数の種類が組み合わせられて発現しており、多くの発現が片方の染色体のみに由来していた。この様に  $\alpha$  アイソフォーム発現は各染色体レベルで独立して遺伝子制御されており、単一神経細胞では両方の染色体が使われていることが明らかとなった。免疫細胞でのイムノグロブリンや T 細胞受容体、嗅神経細胞でのにおい受容体では対立遺伝子発現排除が知られており、同一細胞においては片方の染色体のみが遺伝子発現に使われている。本研究で明らかとなった CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  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ることが予想され、脳神経系における新たな神経細胞の多様化機構の存在が考えられた (Esumi et al. 2005)。この様に、CNR/プロトカドヘリンは、同じプルキンエ細胞であっても個々の細胞により発現が異なる。この結果は、CNR/プロトカドヘリンの発現は個々の神経細胞の特異性をもたらし、その発現制御機構が神経細胞の多様化、個性をもたらしている可能性を示唆した。今後は、この CNR/プロトカドヘリンの遺伝子クラスターにおける遺伝子制御機構を捉えることにより、脳神経系における神経細胞の多様化機構の解明が可能となると考えている。

また本研究では、CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  とプロトカドヘリン  $\gamma$  とがタンパク質複合体を構成していることを明らかにし、更にこの組み合わせにより CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  タンパク質の細胞膜表面への移動が誘導されることを明らかにした (Murata et al. 2004)。この結果は、 $\alpha$   $\gamma$  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、組み合わせにより更に多様化することが考えられた。また、CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  タンパク質の構造を、NMR を用いたタンパク質構造解析により行い、初めてプロトカドヘリンのタンパク質構造を明らかにすることができた (Umitsu et al. 2005)。このタンパク質構造解析系が確立されたことにより、CNR/プロトカドヘリンの各アイソフォームタンパク質のアミノ酸配列の多様性がどのようなタンパク質の構造、機能の多様性となっているかについて解析することが可能となった。

また、CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  の脳神経系における機能的役割の解析を、発現解析と遺伝子変換マウス作製による解析により行った。遺伝子変換マウスの作製は、生理学研究所グループで行った。マウス大脳皮質発生過程での CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  タンパク質の発現では、CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  が神経回路形成過程で発現が高まり、回路成熟過程で発現の減少がおこることを明らかにした (Morishita et al. 2004a)。

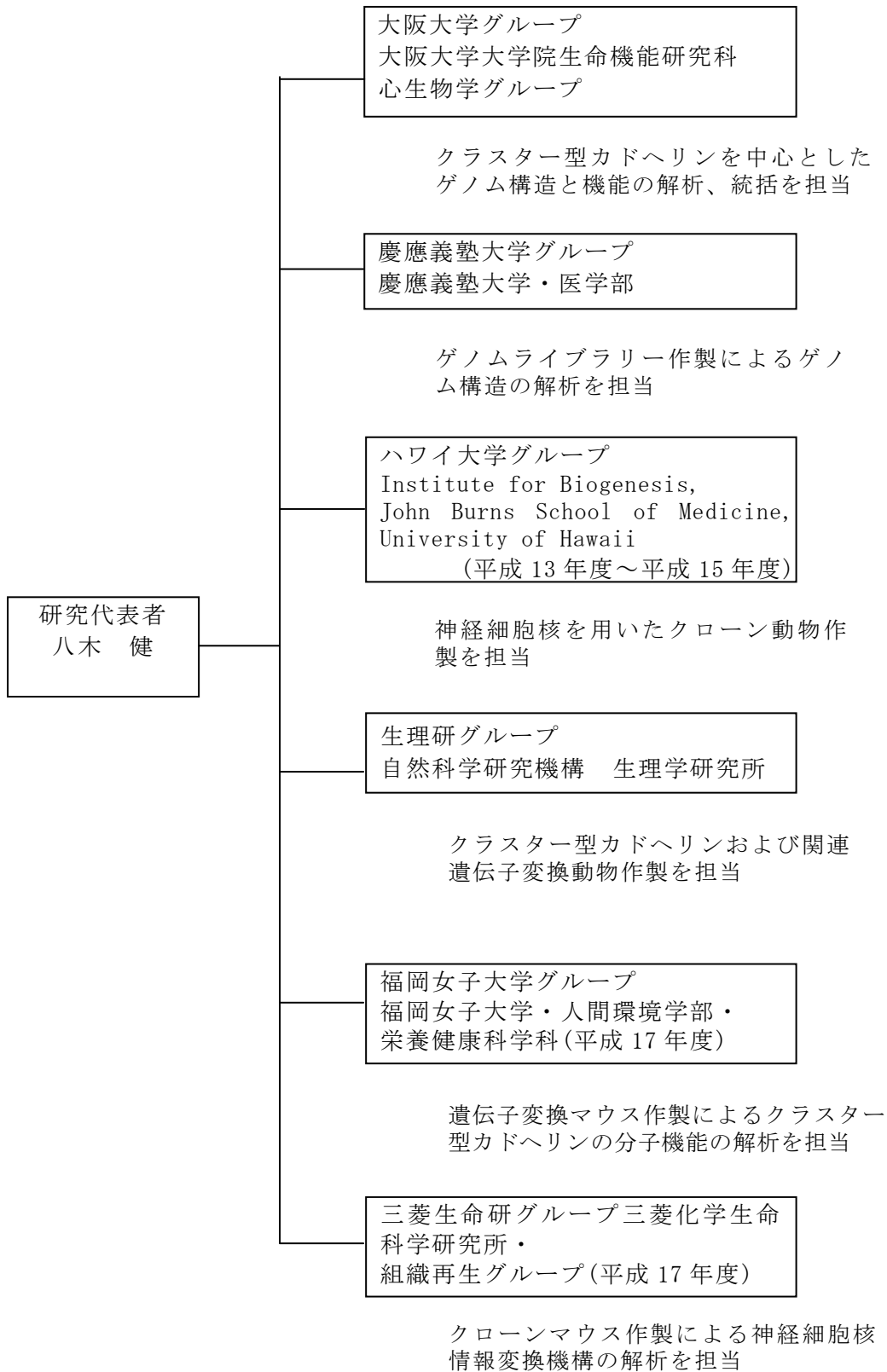
また、この発現減少には神経軸索へのミエリン形成が関与することが明らかとなり、ミエリン不全マウスでは $\alpha$ タンパク質の発現減少が弱まることが明らかとなった(Morishita et al. 2004b)。また福岡女子大学グループとの共同研究では、遺伝子変換マウスの解析により、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ が神経回路形成、情動行動制御、学習・記憶に関わることを明らかにしている。また、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 結合する活性をもつFynチロシンリン酸化酵素は、ドーパミン受容体とNMDA受容体との機能を仲介することが明らかとなり、ヒト統合失調症との関連性も明らかとなっている。この様な状況より、CNR/プロトカドヘリン遺伝子群とヒト精神神経疾患との関連性についての解析が進められている。

脳は動物種ごとに構造や機能が異なる多様化した器官である。本研究では、CNR/プロトカドヘリンのゲノム構造の意義を探る目的で、脳機能の多様化、高度化に関連した動物種におけるゲノム DNA BAC ライブラリーを慶應大学グループが作製して、CNR/プロトカドヘリンのゲノム構造の解析を、慶應大学グループと大阪大学グループにより解析した。その結果、魚類では、ゼブラフィッシュ(Tada et al. 2005)、メダカ、両生類では、ゼノパストロピカリス(Ishii et al. 2005)、鳥類では、ニワトリ、ほ乳類ではニホンザル、ラット、イルカのゲノム構造の解析を行った。これらの結果により、CNR/プロトカドヘリンのゲノム構造は、クラスター単位で多様化しており、動物種によってクラスター構造が多様化していることが明らかとなった。また興味深いことに、同じ魚類でもゼブラフィッシュとメダカでは、クラスター構造が異なるだけでなく、同じ遺伝子クラスターに属する可変領域エクソンにおいても、異種間での配列保存性が低く、それぞれの動物種に特徴的な遺伝子配列となっていた。これは遺伝子クラスターにおける同一種における遺伝子配列均一化が顕著に起こっていることを示唆した。これらの研究は世界的にはスタンフォードのグループと競合となり、彼らはゼブラフィッシュの一部、シーラカンスの遺伝子クラスターを発表した。また、同一種における遺伝的多型をマウスとヒトで解析した結果、野生マウス系統 12 種、ラボマウス系統 4 種において、CNR/プロトカドヘリン遺伝子クラスター内の遺伝子変換、GC 含量の不均一化、同一亜種内での遺伝子配列均一化が起っていることが明らかとなった。また、この遺伝的多型、分子進化に一定の方向性があることを明らかにした。更に、遺伝子変換と GC 含量の増加に強い関連性があることも示唆された(Taguchi et al. 2005)。

ヒト集団における CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 、 $\beta$ クラスターにおける遺伝的多型の解析を行った結果、いずれのクラスターにおいても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、遺伝子欠損アレルが明らかとなった。また、この解析により、可変領域エクソン配列においてアイソフォーム間で相同性の高いカドヘリンドメインでは、各可変領域エクソン相互での遺伝子変換が認められ、これらの領域での遺伝的多型の頻度が極めて高くなっていることが明らかとなった(Miki et al. 2005)。これらの結果は、ヒト脳機能の多様性、脳機能疾患との関連性を考えて行く上で興味深い。以上のように、CNR/プロトカドヘリンは進化の過程で多様化が顕著に見られる分子群であり、動物種に特異的な遺伝的多型の獲得が起っていることから、脳の進化において興味深い分子群であると考えられた。



(2) 実施体制



### 3. 研究実施内容及び成果

#### 3. 1 クラスター型カドヘリンのゲノム構造と機能の解析(大阪大学グループ)

##### (1)研究実施内容及び成果

##### 1)CNR/プロトカドヘリン遺伝子の脳神経系体細胞レベルにおける遺伝子変換の解析

脳神経系を構成している神経細胞は多様化し、複雑であるが組織化された神経回路を形成している。免疫系を構成する細胞種も多様化しており、この細胞種の多様化には多様化膜分子群の DNA 再編成が関わっていることが知られている。脳神経系と免疫系では、また多くの細胞死が起こることが知られており、近年 DNA 修復酵素である DNA ligase IV 及び XRCC4 欠損マウスにおいて、免疫系細胞での DNA 組み換え異常だけでなく、神経細胞分化過程においても細胞死増加の異常が生じることが明らかとなり、神経細胞分化過程における染色体 DNA レベルでの遺伝的変化の可能性が示唆された。

また、本研究グループでは、脳神経系で発現する新たな多様化膜分子群である CNR/プロトカドヘリンを発見し、このゲノム構造が、免疫系で DNA 組み換えを起こす多様化膜分子群と類似した遺伝子クラスターを形成していることを明らかにした。これらの結果より、本研究では CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  に遺伝子変換が起こっている可能性を考え、1)転写産物での遺伝子変換の解析、2)マウス脳ゲノム DNA を用いた遺伝子変換の解析を行った。CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  転写産物を RT-PCR 法を用いて解析した結果、生後 1 と 60 日のマウス大脳皮質では、コントロールで用いた E-カドヘリンに比べ、また胎生 15 日と比べて塩基置換頻度が有意に高かった。

しかし、RT-PCR 法による解析では PCR エラーを多く含んでいることより、より正確な塩基置換の解析を行う必要がある。本研究では、胎生 18 日目、生後 1 日目、7 日目、10 日目、60 日目のマウス大脳皮質からそれぞれ CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  特異的逆転写プライマーを用いて、cDNA ライブラリーを作製し、CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  1~12 をスクリーニングし、得られたクローン全長をシーケンス解析した。cDNA ライブラリーの作製には、N-カドヘリンと  $\beta$  アクチンの特異的逆転写プライマーを同時に用い、コントロールとした。

その結果、合計 710 個の CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  cDNA クローンをスクリーニングにより同定し、1,303,062bp のシーケンス解析をした。また、コントロール分子として、N-カドヘリン 430 クローン(914,795bp)、 $\beta$ -アクチン 302 クローン(325,624bp)の解析を行なった。生後 1 日目以外の *Pcdh- $\alpha$*  転写産物の変異率はコントロール分子の N-カドヘリンと比較して有意な差は認められなかった [*Pcdh- $\alpha$*  vs N-カドヘリン; E18.5 ( $0.6 \times 10^{-5}$  vs  $1.6 \times 10^{-5}$ ), P7 ( $1.5 \times 10^{-5}$  vs  $1.4 \times 10^{-5}$ ), P10 ( $2.2 \times 10^{-5}$  vs  $2.4 \times 10^{-5}$ ), P60 ( $1.2 \times 10^{-5}$  vs  $2.3 \times 10^{-5}$ )] (図 1)。

一方、生後 1 日目では 161 個の CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  cDNA クローンから 16 個の塩基置換が認められ、1 塩基当たりの変異率は  $4.8 \times 10^{-5}$  と高かった。同じライブラリーから得られた N-カドヘリンと  $\beta$ -アクチンの変異率はそれぞれ  $1.4 \times 10^{-5}$  と  $1.8 \times 10^{-5}$  であり、統計学的解析からも生後 1 日目の CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  転写産物の変異率は有意に高いことが示された ( $P < 0.01$ )。また、生後 1 日目で得られた塩基置換は G から A への置換が 25%を占め、N-カドヘリン(6.3%)や生後 1 日目以外の CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  (6.7%)と比較して高いことが示された。

表1 Alterations in the *Pcdh-α* transcripts

	Library	Number of clones	Total length (bases)	Average insert size (bp)	Altered clones	Substitutions	% of Altered clones	Frequency of base substitution ( $\times 10^{-5}$ )
E18.5 <i>Pcdh-α</i>	A	42	89060	2120	1	1	2.3	1.1
	B	29	62421	2152	0	0	0	0
	<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>151481</b>	<b>2152</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1.4</b>	<b>0.6</b>
<i>N-cadherin</i>	A	40	92635	2316	2	2	5.0	2.2
	B	38	92673	2439	1	1	2.6	1.1
	<b>Total</b>	<b>78</b>	<b>185308</b>	<b>2376</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3.8</b>	<b>1.6</b>
P1 <i>Pcdh-α</i>	C		116080	2111	6	6	10.9	5.2
	D	60	130637	2375	6	6	10.0	4.6
	E	46	86636	2271	4	4	10.2	4.6
<b>Total</b>	<b>161</b>	<b>333353</b>	<b>2145</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>10.3</b>	<b>4.8</b>	
<i>N-cadherin</i>	D	78	176150	2258	2	2	2.5	1.1
	E	60	107962	1799	2	2	3.3	1.9
	<b>Total</b>	<b>138</b>	<b>284112</b>	<b>2058</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2.8</b>	<b>1.4</b>
<i>β-actin</i>	D	169	176150	1042	3	3	1.5	1.7
	E	133	149474	1123	3	3	2.2	2.0
	<b>Total</b>	<b>302</b>	<b>325624</b>	<b>1078</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>2.0</b>	<b>1.8</b>
P7 <i>Pcdh-α</i>	F	45	102570	2279	2	2	4.4	1.9
	G	41	82169	2004	1	1	2.4	1.2
	H	41	78500	1915	1	1	2.4	1.2
<b>Total</b>	<b>127</b>	<b>263239</b>	<b>2072</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3.1</b>	<b>1.5</b>	
<i>N-cadherin</i>	F	18	42874	2382	0	0	0	0
	G	20	35488	1774	1	1	5.0	2.8
	H	35	76428	2184	1	1	2.8	1.3
<b>Total</b>	<b>73</b>	<b>154863</b>	<b>2113</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2.6</b>	<b>1.4</b>	
P10 <i>Pcdh-α</i>	I	43	89907	2090	2	2	4.6	2.2
	J	52	104888	2017	2	2	3.8	1.9
	K	59	125386	2125	3	3	5.0	2.4
<b>Total</b>	<b>154</b>	<b>320181</b>	<b>2077</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>4.5</b>	<b>2.2</b>	
<i>N-cadherin</i>	I	32	60801	1900	1	1	3.1	1.6
	J	36	77052	2140	2	2	5.5	2.5
	K	32	66970	2092	2	2	6.2	3.0
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>204823</b>	<b>2048</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5.0</b>	<b>2.4</b>	
P60 <i>Pcdh-α</i>	L	80	181805	2272	3	3	3.7	1.6
	M	27	53003	1963	0	0	0	0
	<b>Total</b>	<b>107</b>	<b>234808</b>	<b>2194</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2.8</b>	<b>1.2</b>
<i>N-cadherin</i>	M	41	85689	2089	2	2	4.8	2.3
	<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>85689</b>	<b>2089</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4.8</b>	<b>2.3</b>

図1 CNR/プロトカドヘリン転写産物における塩基置換の解析

RT-PCRを用いた以前の研究では生後1日目だけではなく生後60日目においてもCNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 転写産物の変異率が高かったが、PCRによるエラーを排除した方法で詳細に解析した結果、生後60日目のCNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 転写産物の塩基置換は $1.2 \times 10^{-5}$ であり、コントロールと差が無かった。よって、以前の結果は、PCRエラーを反映したものであった。一方、生後1日目ではPCRによるエラーを排除した解析でも変異率が高いこと、GからAへの塩基置換に偏りがあることからCNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 遺伝子の塩基置換の可能性は完全に否定できなかった。

また、マウス脳ゲノムDNAライブラリーを用いた遺伝子変換の解析を行った結果、得られた11クローンの1つで、本来のゲノムDNA構造とは異なるゲノムDNAが得られた(図2)。このゲノムDNAは、ribosomal DNAゲノムの28S領域に可変領域と定常領域を含むイントロンレスCNR/プロトカドヘリン $\alpha 6$ のDNAが挿入されたものであった。また、このイントロンレスCNR/プロトカドヘリン $\alpha 6$  DNAには、予想プロモーター領域

と 10 個の塩基置換が見つかった。この塩基置換では、G から A、T から C への置換頻度が高く認められた。また、このイントロンレス CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  DNA は、マウス脳において PCR 法により約 15% のサンプルで検出することができた。最近、神経細胞分化に伴う LINE 配列のレトロトランスポジションがマウス脳で起こっていることが報告された。この L1 における逆転写反応による再挿入 DNA では、G から A、T から C への塩基置換頻度が高いことが明らかとなっている。これらの結果より、本研究により得られたイントロンレス CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  は神経細胞分化過程におけるレトロトランスポジションにより引き起こされた可能性が考えられた。しかし、脳神経系における CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  では、免疫系におけるイムノグロブリンや T 細胞受容体のような分化プログラムでの DNA 再編成が認められなかった。

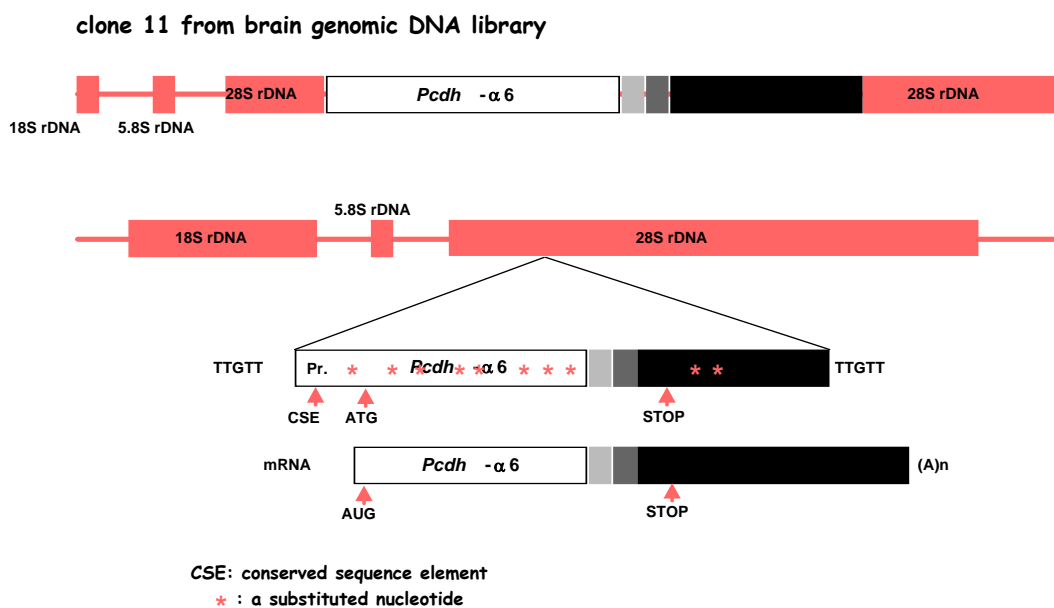


図2 マウス脳ゲノム DNA ライブラリーより単離された遺伝子変換 DNA 断片

## 2) 単一神経細胞における CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 転写産物の発現パターンの解析

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。それぞれの神経細胞が異なった神経回路を築くためには、個々の神経細胞レベルでの多様化が起こっていることが考えられる。脳神経系で発現する多様化膜分子群である CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  遺伝子は、ゲノム上で遺伝子クラスター構造をもっており、可変領域エクソンのうち 1 つと、共通領域のエクソンがスプライシングして mRNA が産生されることがわかっている。これまでの我々の研究で、個々の神経細胞において CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  遺伝子の可変領域エクソンは異なる発現をしていることが示されてきたが、染色体レベルでの詳細な発現パターンについては不明であった。そこで本研究では、マウス単一神経細胞における CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  遺伝子の発現制御を対立染色体レベルで解析した。

染色体レベルでの CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  遺伝子の発現調節機構を解析するには

mRNA が 1 対あるどちらの染色体由来であることを識別する必要がある。本研究では、まずマウス亜種間における CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  遺伝子の多型解析を行った(後章参照)。その結果、MSM マウス系統では C57BL/6 (B6) マウス系統と比較して、全ての可変領域エクソンにおいて遺伝的多型が認められた。そこで、B6 と MSM マウスを交配することにより MSM/B6 の F1 マウスを得、その F1 マウスの単一神経細胞を用いることにより、発現している mRNA がどちらの染色体由来であるのかを、遺伝的多型を用いて解析した(図 3)

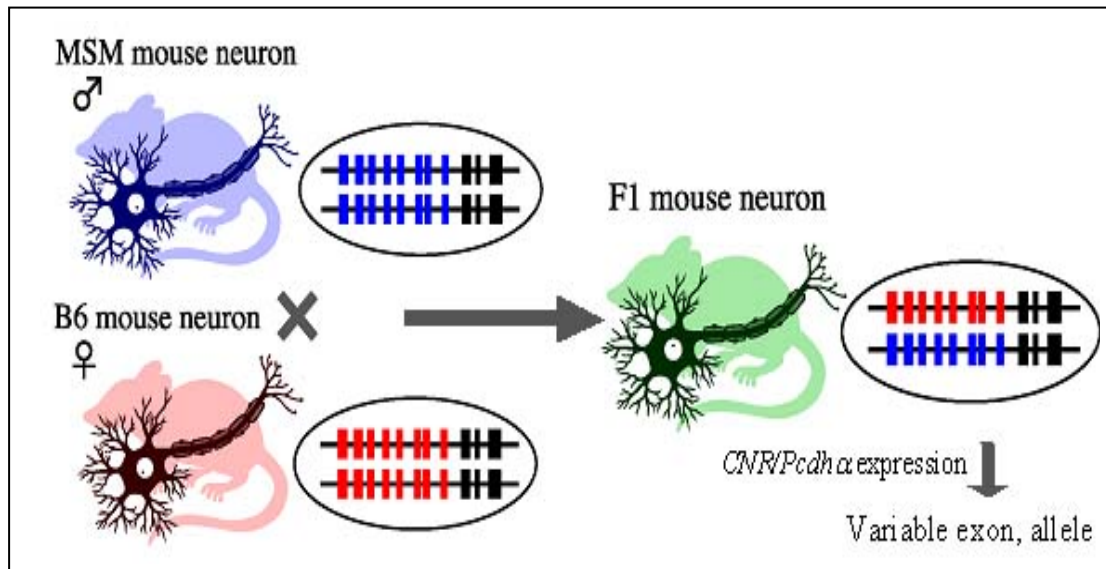


図 3 MSM/B6 の F1 マウスを用いた単一神経細胞における染色体レベルでの発現制御の解析

生後 5 日齢の大脳皮質の細胞を用いた single-cell RT-PCR では、cDNA が少ないため十分な検証ができず、本研究では大型で mRNA を大量に含んでいる小脳プルキンエ細胞を用いて解析を行った。

小脳プルキンエ細胞における CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  遺伝子の発現を調べるために B6 マウス小脳に対して in situ hybridization 法を用いた解析を行った。その結果、生後 21 日齢の小脳プルキンエ細胞全てで強い CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  の発現シグナルを確認することができた(図 4)。また、それぞれの CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  アイソフォームのプローブでは、一部のプルキンエ細胞でのみシグナルが確認された。この結果は各小脳プルキンエ細胞において、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  アイソフォームの発現が異なっている可能性を示唆していた。

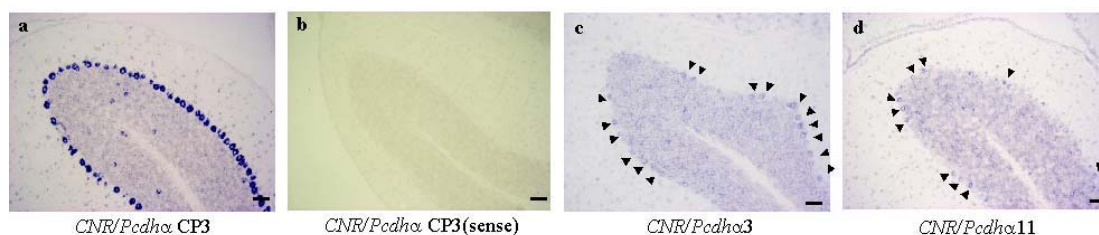


図 4 プルキンエ細胞における CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  の発現パターンの解析

そこで、分注 single-cell RT-PCR 法を用いて、生後 21 日齢の F1 マウスの小脳プルキンエ細胞における CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ アイソフォームの発現解析を行った。その結果、28 個の単一プルキンエ細胞で、3 つに分注して、独立に解析した RT-PCR 法において一致した PCR 増幅バンドを得ることができた(図 5)。

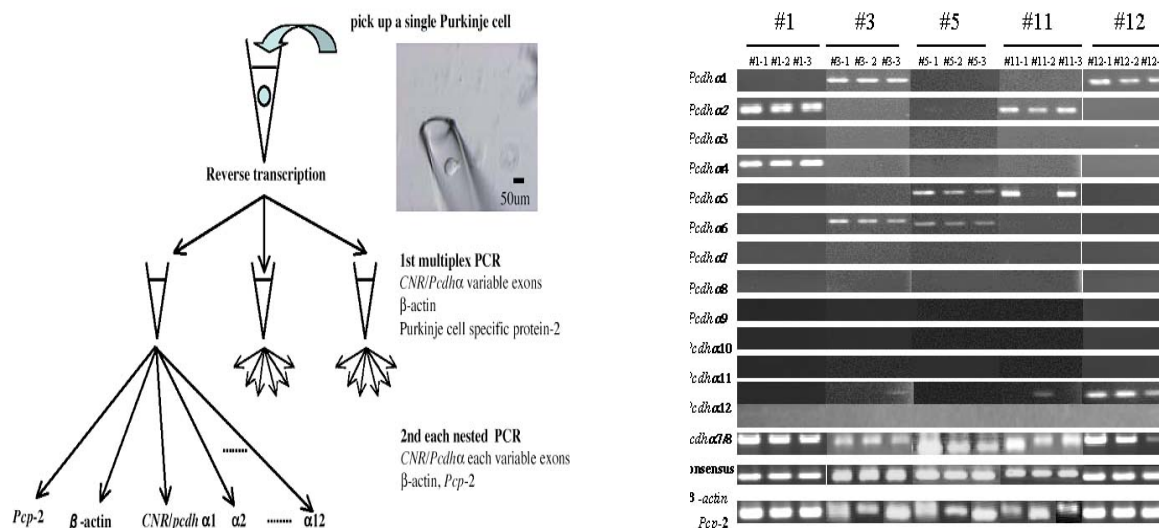


図 5 分注 PCR 法を用いた CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ の発現パターンの解析

更に、そのバンドを直接塩基配列解析することにより遺伝子産物の由来する染色体を決定した。その結果、単一神経細胞において CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ アイソフォームは複数種類発現していた。興味深いことに、各 CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ アイソフォームの多くは対立染色体の片方のみ由来していることが明らかになった。また、父方のみ、母方のみ染色体に偏った遺伝子発現は認められずゲノムインプリンティングの調節ではないことがわかった。これらの結果から、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ アイソフォームの発現は各染色体単位で独立して制御されており、単一神経細胞では両方の染色体が別々に使われていることが明らかになった。

本研究から、単一神経細胞レベルにおいて CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  遺伝子の可変領域の発現には多様化した遺伝子発現を行なう分子メカニズムがあることがわかった。CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  遺伝子は、これまでに知られている 3 つのタイプ(X 染色体不活性化、genomic imprinting、allelic exclusion)とは異なり、各染色体単位で独立して発現制御されていることが明らかとなった(図 6)。また、単一神経細胞レベルでは両方の染色体が別々に使われていることより、今までに知られていない新しいタイプの allelic な遺伝子発現調節機構であることが示唆された。これらの結果は、脳神経系での新たな遺伝子制御システムの存在を示唆するものであり、個々の神経細胞多様化機構を捉える中で、興味深いものであった。

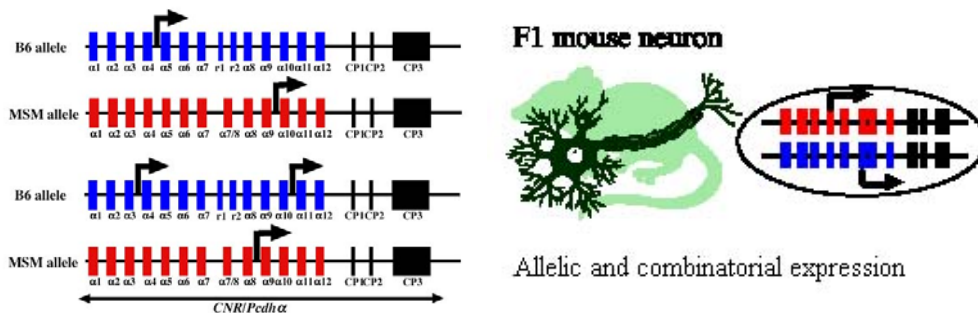


図6 単一神経細胞における CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ の発現パターン

### 3) CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ と $\gamma$ の複合体形成とその生理的意義の解析

CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 、プロトカドヘリン $\gamma$ は、それぞれが独立した遺伝子クラスターを形成しており、共に可変領域エクソンと定常領域エクソンから構成されている。

両ファミリーはカドヘリンスーパーファミリーに属することより、神経細胞間における認識・接着因子であると考えられている。いずれの遺伝子クラスターも神経細胞ごとに異なった発現パターンをもつことが示唆されているが、この両者の関連性についての解析はほとんど無かった。本研究では、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ とプロトカドヘリン $\gamma$ との関連性を生化学的にタンパク質レベルで解析することを行った。その中で、脳組織におけるタンパク質の局在、脳におけるタンパク質複合体の形成、その生理的意義について解析を行った。

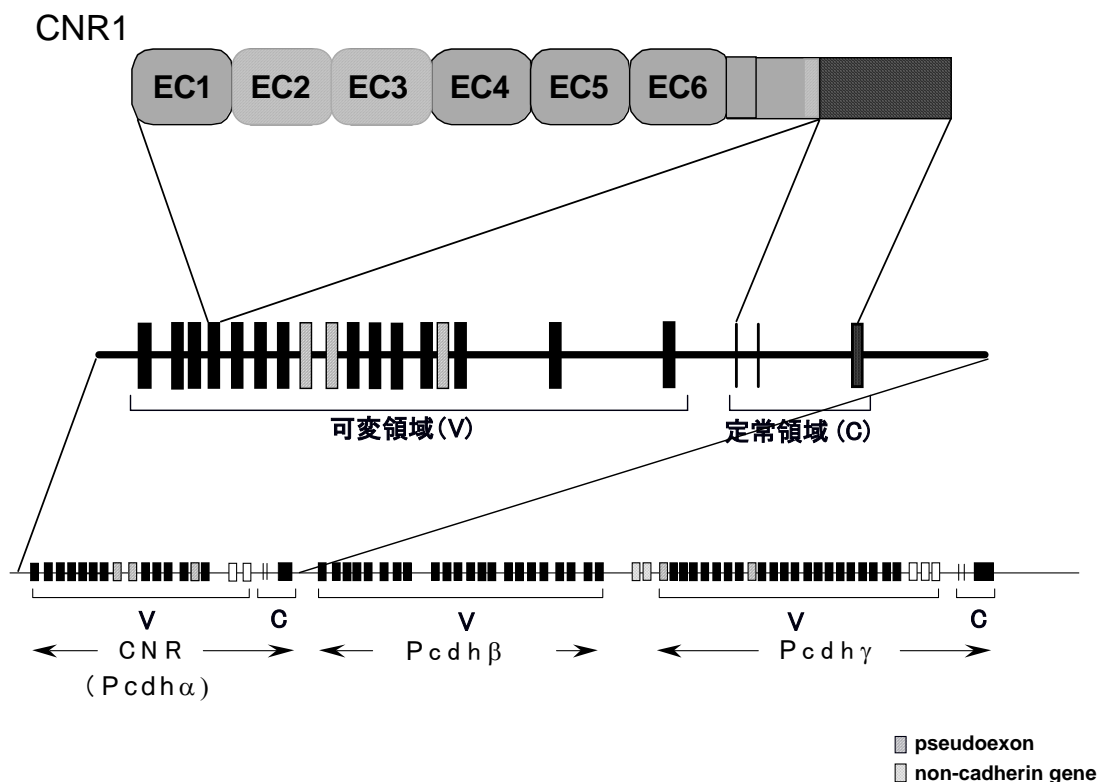


図7 CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ とプロトカドヘリン $\gamma$ の遺伝子クラスター

CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ とプロトカドヘリン $\gamma$ は神経系において共に強い発現が認められている。そこで、両者の細胞内領域に対する特異的抗体を作製し、免疫染色を行なうことにより脳組織及び海馬神経培養細胞における局在を比較検討した。その結果、両タンパク質は脳全体にその発現が認められ、共焦点顕微鏡を用いた解析から海馬 CA1、CA3 領域、培養神経細胞において部分的な局在の一致が認められた。また、シヨ糖密度勾配遠心法によるタンパク質分画では、シナプス膜分画、後シナプス膜分画の分画において両タンパク質が共存していた。以上の結果から、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ とプロトカドヘリン $\gamma$ の両者がタンパク質複合体を形成している可能性が示唆された。

両者の複合体形成の有無を検討する目的で、生後 1 週齢マウスの脳よりタンパク質抽出液を調整し、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ またはプロトカドヘリン $\gamma$ の細胞内領域に対する特異抗体を用いて免疫沈降実験を行った。その結果、図 8 で示すように、マウス脳において両者がタンパク質複合体を形成していることが示唆された。なお、脳神経系で高発現する N-カドヘリンが CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 及びプロトカドヘリン $\gamma$ とはタンパク質複合体を形成しないことから、特異的に CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ とプロトカドヘリン $\gamma$ が複合体を形成していることが強く示唆された。また、マウスにおいては 12 種類の CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 、22 種類のプロトカドヘリン $\gamma$ が存在していることから、両者がタンパク質複合体を形成する際の CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ のサブファミリーとプロトカドヘリン $\gamma$ のサブファミリー間での組み合わせの特異性について検討した。2 種の CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ と 4 種のプロトカドヘリン $\gamma$ の間でのタンパク質複合体形成を培養細胞に過剰発現させ免疫沈降実験を行ったところ、全ての組み合わせで CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ のサブファミリーとプロトカドヘリン $\gamma$ がタンパク質複合体を形成することが明らかとなった。これらの実験結果から、生体内では様々な組み合わせからなる CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ のサブファミリーとプロトカドヘリン $\gamma$ のタンパク質複合体が存在することが考えられた。

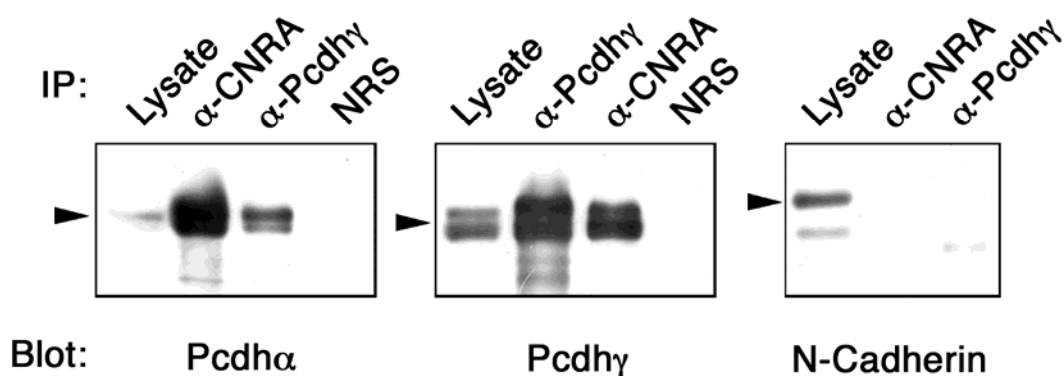


図 8 CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ とプロトカドヘリン $\gamma$ のタンパク質複合体

CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 以外のプロトカドヘリンやクラシカルカドヘリンは容易に細胞膜上に発現するが、その一方で CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ は培養細胞などに過剰発現させるとその大部分がゴルジ体、小胞体 (ER: endoplasmic reticulum) 等に蓄積し



細胞膜上での発現がほとんど認められなかった。膜タンパク質の中には、他の膜タンパク質と相互作用することによって効率よく細胞膜上に発現することが報告されている。そこで、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ についても同様の現象が認められるかどうかを検討することにした。培養細胞株 HEK293 細胞に CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  とプロトカドヘリン $\gamma$  を同時に過剰発現させたところ、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  の細胞膜上での発現量の増加が細胞免疫染色の解析から示された(図 9)。更に、複数種あるプロトカドヘリン $\gamma$  の中で特定のプロトカドヘリン $\gamma$  とのみ CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  にこのような現象が起こり得るものであるかどうかを調べたところ、別の種類のプロトカドヘリン $\gamma$  についても CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  の細胞膜発現に対し同様の活性を有するという結果が得られた。以上の実験結果から、両者の相互作用は CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  の細胞膜上での発現を促進することが明らかとなった。

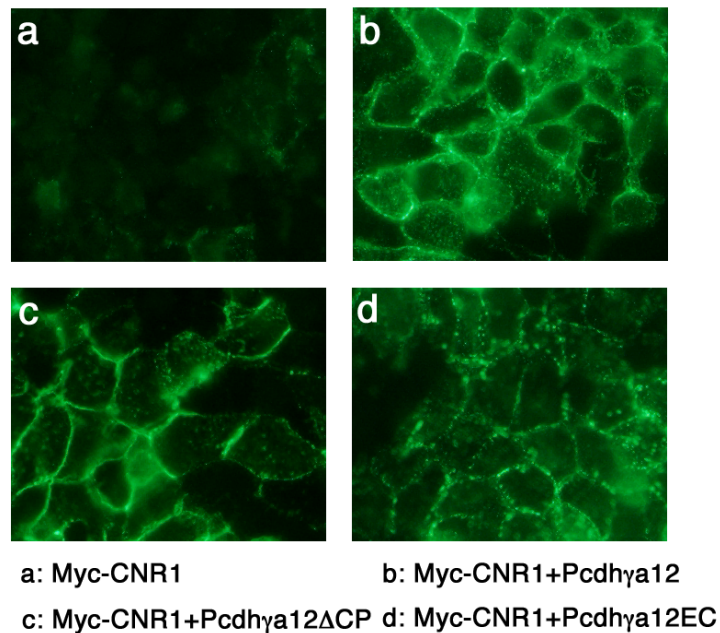


図 9 プロトカドヘリン $\gamma$  による CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  の細胞膜表面への移動の誘導

本研究から神経系において CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  とプロトカドヘリン $\gamma$  の間でのタンパク質複合体の形成が初めて認められた。また、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  の細胞膜上への発現が プロトカドヘリン $\gamma$  との相互作用により促進されることが明らかとなった。これら実験結果から、個々の神経細胞ごとに異なった組み合わせの CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 、プロトカドヘリン $\gamma$  からなる多種多様な細胞外領域を有する膜タンパク質複合体が形成されることが明らかとなった。更に、この多様な膜タンパク質複合体は神経細胞ごとに異なった組成であることから、個々の神経細胞のアイデンティティの獲得につながるということが考えられる。また、両膜タンパク質が細胞外領域を介して細胞可能性が示唆される。また、プロトカドヘリン $\gamma$  との相互作用による CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  の細胞膜表面への発現誘導の分子機構を解析することにより、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  のみならず膜タンパク質の神経細胞膜発現制御についての新たな分

子機構の解明につながる可能性がある。

#### 4) CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ による細胞接着活性の解析

CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ は、最初のリピート (EC1) にマウスの CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  分子間でよく保存された RGD (Arg-Gly-Asp) モチーフを持つ。RGD モチーフはフィブロネクチン/インテグリンの結合に代表されるタンパク質間相互作用モチーフとしてよく知られている。CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  はマウス脳において様々な領域で発現し、シナプス後膜 (PSD) 分画での濃縮が認められている。しかし CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  は細胞接着分子だと考えられていたにも関わらず、その接着活性の有無は明らかになっていなかった。

クラシックカドヘリンとプロトカドヘリンを含むカドヘリンスーパーファミリーは、カルシウム依存性のホモフィリックな接着分子として細胞間認識と接着を制御すると考えられている。ラットプロトカドヘリン2とプロトカドヘリン3はL細胞に過剰発現させると、弱い細胞接着活性を示す。従って、プロトカドヘリンの細胞外領域は、弱いとはいえカドヘリンと同様ホモフィリックな接着活性を持つものと思われた。

本研究ではマウス CNR1 (CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 4) タンパク質に細胞接着活性があるかどうかを明らかにすることを目的とした。しかし CNR1 は細胞接着実験に繁用される L 細胞等の細胞株に発現させると、細胞内膜に集積してしまっただけのため、接着実験ができなかった。しかし、我々は CNR1 を HEK293T 細胞に発現させた場合、CNR1 タンパク質の一部が細胞膜上に発現することを見出した。このことを利用して、HEK293T 細胞を用いた細胞接着実験を行い CNR1 の接着活性を測定した。その結果、CNR1 を発現した HEK293T 細胞ではカルシウム依存性の接着活性の亢進を認めた (図 10)。

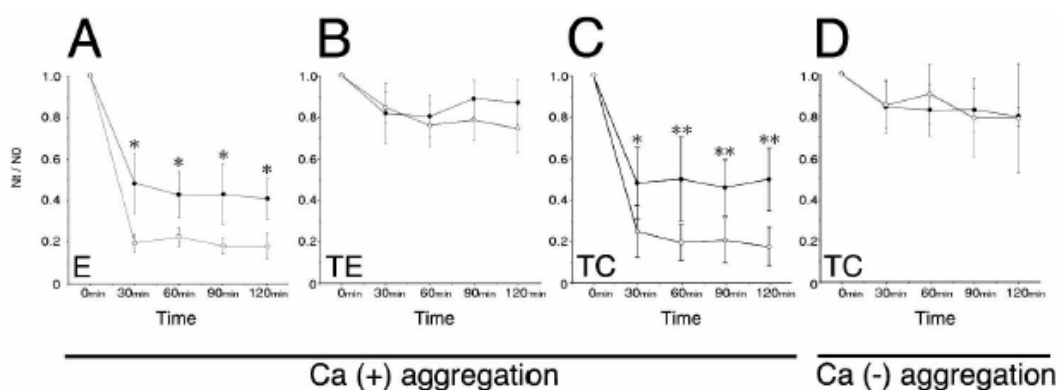


図 10 白丸が CNR1 発現細胞、黒丸が HEK293T 細胞。E: EDTA 処理、TE: Trypsin/EGTA 処理、TC: Trypsin/Ca 処理

CNR1 発現細胞は、細胞接着活性を持つことが示唆された。しかし、支持体に CNR1 細胞外ドメインを固着させて、CNR1 特異的な細胞接着能を測定したところ、CNR1 を発現させていない HEK293T 細胞を用いた場合でも、細胞接着能をもつことが明らかとなった。その結果、HEK293T 細胞に内在する細胞膜分子と CNR1 タンパク質との相互作用による細胞接着能が示唆された。

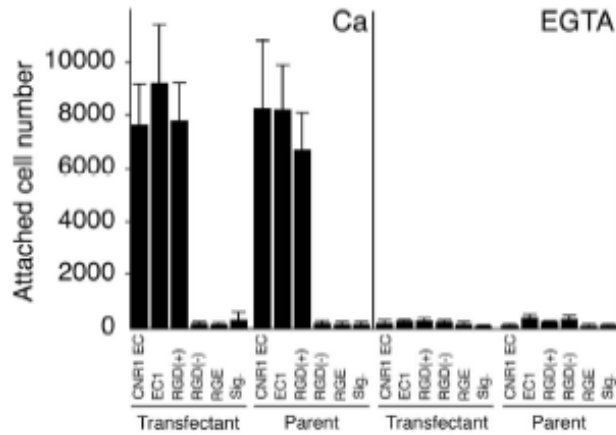


図 11 HEK293T 細胞と相互作用する CNR1 タンパク質領域の解析。  
RGD モチーフがカルシウム依存的な細胞接着能に必要であった。

次に、HEK293T 細胞内在性の接着分子と CNR1 が相互作用している可能性について検討した。この接着活性はカルシウム依存性であること、またカルシウム依存性のトリプシン耐性を示すこと、RGD ペプチドと抗  $\beta 1$ -integrin 抗体で濃度依存的に阻害がかかることが明らかとなり、更に CNR1 の一番目のカドヘリンリピート (EC1) 内の RGD モチーフはこのヘテロフィリックな細胞接着活性に必須であった (図 11)。

以上の結果から CNR1 は CNR1 同士のホモフィリックな結合活性より、 $\beta 1$ -integrin とのヘテロフィリックな結合活性を持っていることが強く示唆された。CNR1 mRNA のノザンブロット解析を行なうと、E14 胎児から検出され始め、発現レベルは生後 10 日前後まで増加する。P10 以後、CNR1 遺伝子の発現は徐々に減衰する。この CNR と  $\beta 1$ -integrin のマウス小脳発生におけるタンパク質局在を解析したところ、両者の時空間的な局在の一致が観察された。マウス小脳発生におけるシナプス形成の場で、CNR と  $\beta 1$ -integrin のタンパク質の相互作用が示唆された。

5) 神経回路形成期における CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ ファミリータンパク質の神経軸索発現

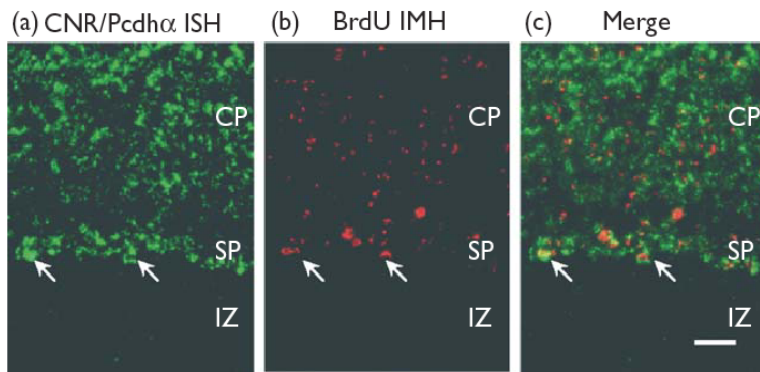


図 12 CNR のサブプレートでの発現。生後 1 日目大脳皮質における BrdU 標識 (b, c) (胎生 11 日投与) されたサブプレート神経細胞における CNR mRNA の発現 (a, c)

本研究では全ての CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ ファミリーに共通に含まれる細胞内領域に対する抗体とプローブを新たに作成し、これらを用いて免疫組織染色 *in situ* hybridization を行った。

大脳皮質においては、出生前後の回路形成期に一致して、神経

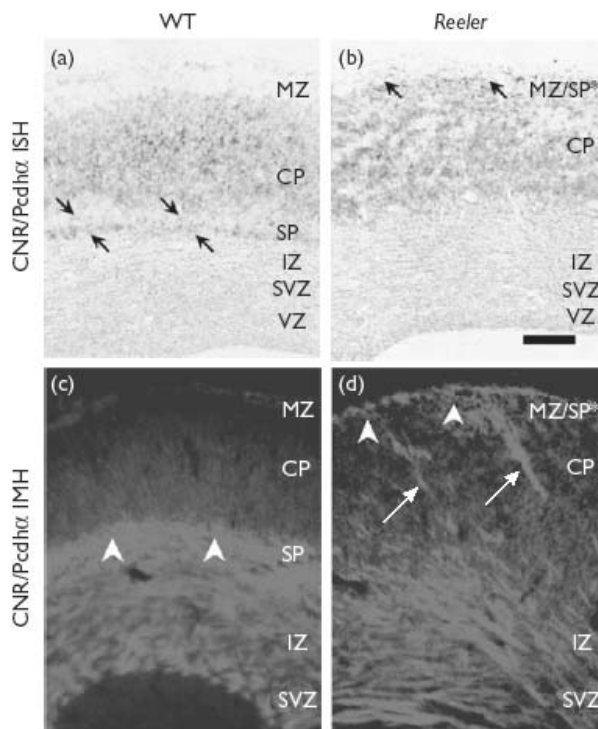


図 13 CNR のサブプレートでの発現。正常マウス (a, c) と *Reeler* マウス (b, d) (胎生 16.5 日) における CNR ファミリーの *in situ* hybridization (a, b) と免疫染色 (c, d)。*Reeler* マウスではサブプレートの位置異常を来しているが、その位置の変化に対応した CNR の発現場所の変化が観察される。

繊維が存在する intermediate zone, やサブプレートにおいて CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ タンパク質の局在を認めた。またこれらの領域での神経繊維マーカーとの 2 重染色により、視床-皮質路、皮質遠心路の軸索、ならびに、両繊維の形成に重要な役割を果たすことが知られているサブプレート神経細胞での発現を認めた。サブプレート神経細胞における発現については、サブプレートマーカー (CSPG, もしくは胎生 11 日前後における BrdU 標識 (図 12)) と CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  との 2 重標識、ならびに *Reeler* マウスにおけるサ

ブプレート神経細胞の位置異常に対応した CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  の局在の変化により確認された (図 13)。サブプレート神経細胞は、その破壊実験の結果、視床から皮質への繊維投射異常、大脳皮質に

おける機能単位である眼優位性カラム、方位選択性カラムの形成不全を来すことが知られており、サブプレート神経細胞には回路形成の特異性を担う多様化した膜分子が存在するのではないかと想像されてきた。この点からも多様化した CNR/プロトカドヘ

リン $\alpha$ ファミリーがサブプレート神経細胞に発現していることは興味深い。なお CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ ファミリーは、大脳皮質以外の領域においても、出生前後に主要軸索繊維に強い局在を認め、神経回路形成過程に対応した軸索発現が明らかとなった。

#### 6) ミエリン化による CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ タンパク質の神経軸索発現制御

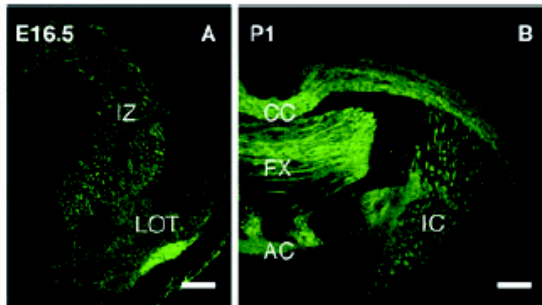
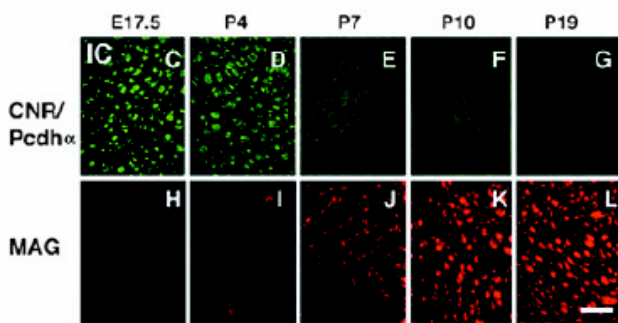


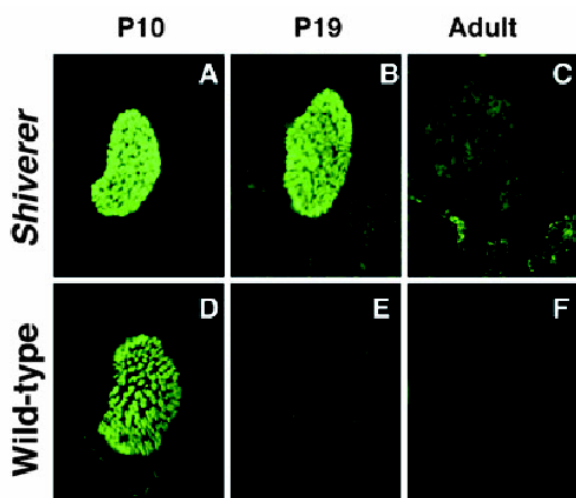
図 14 神経回路形成期における CNR タンパク質の神経軸索への一過性局在。CNR タンパク質は出生前後に主要神経軸索に局在する (A, B, C, D) が、生後軸索のミエリン化 (H-L) と共に、軸索での局在は減衰する (C-G)。



本研究では引き続き、出生前後で強い軸索発現を示す CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ ファミリータンパク質の、その後の神経回路成熟過程における局在変化を解析した。その結果、強い発現の見られた内包、Lateral Olfactory Tract, 視索といった主要軸索繊維において、生後一週間前後より急激な発現の減衰を認め、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ ファミリーの神経回路形成・成熟過程に

対応した軸索発現制御の存在を確認した (図 14)。

なお、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ タンパク質の軸索からの減衰は、ミエリン関連タンパク質の発現上昇と対応していた。そこでミエリン形成不全を有するシバラーマウスにおける CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ の発現を解析した所、視神経軸索において CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ タンパク質の減衰の遅れを認めたことから (図 15)、ミエリン化が CNR/



プロトカドヘリン $\alpha$ タンパク質の軸索からの減衰の誘因になっていることが明らかとなった。以上の正常発達過程、ならびにミエリン形成不全状態における CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ ファミリーの発現変化は、神経回路形成との関与が知られている L1 や GAP-43 といった分子の挙動と類似していた。以上のことから CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ ファミリーの発現とその制御機構は、神経回路の形成・成熟過程に密接に関連していることが示唆された。

図 15 ミエリン形成不全マウスの視神経軸索における CNR タンパク質の軸索局在減衰の遅れ。神経回路形成期 (生後 10 日目 (A, D), 生後 19 日目 (B, E)、成体 (C, F)) におけるマウス視神経軸索の CNR タンパク質の免疫染色 (緑)。ミエリン形成不全 shiverer マウス (A, B, C) では正常マウス (D, E, F) に比べ、CNR タンパク質の軸索局在減衰が遅れる。

## 7) CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ タンパク質第一カドヘリン領域のタンパク質立体構造決定

プロトカドヘリンタンパク質は、6個の細胞外カドヘリンドメイン(EC)、一回膜貫通領域、及び細胞質領域よりなり、カドヘリンスーパーファミリーにおいて最大のグループを形成する。これまでにスーパーファミリーのうち、古典的カドヘリンに関しては、その立体構造の決定により、接着能の発現に重要なN末端の第一カドヘリン(EC1)領域の詳細な機能領域が明らかにされているが、プロトカドヘリンに関してはタンパク質の立体構造の報告がなかった。我々はプロトカドヘリンEC1領域(CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 4-EC1)のNMR測定によるタンパク質の立体構造解析を行った。大腸菌由来組み換えCNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 4-EC1タンパク質は、封入体より可溶化変性、refoldingの後、カラムクロマトグラフィーにより精製された。精製後のタンパク質はNMR測定にとって非常に不安定であったが、カルシウムを加えた状態でrefoldさせることで、NMR測定の範疇に入ることとなった。それでもpH8.9、0.1mMカルシウムという困難な

条件で、極低温検出器を用いることによって初めて化学シフトの帰属と、距離情報の取得が可能となった。主鎖、側鎖の帰属を行い(図16)、データをBioMagRes Bankに登録した。その後構造計算を行い、立体構造を決定し、座標をProtein Data Bankに登録した。得られた立体構造は、古典的カドヘリンとよく似た $\beta$ シートよりなるfoldであったが、ループ部分などの詳細な構造は、古典的カドヘリンとは大きく異なっていた。本研究により決定されたプロトカドヘリンタンパク質の立体構造は、カドヘリンスーパーファミリーの中では古典的カドヘリン以外

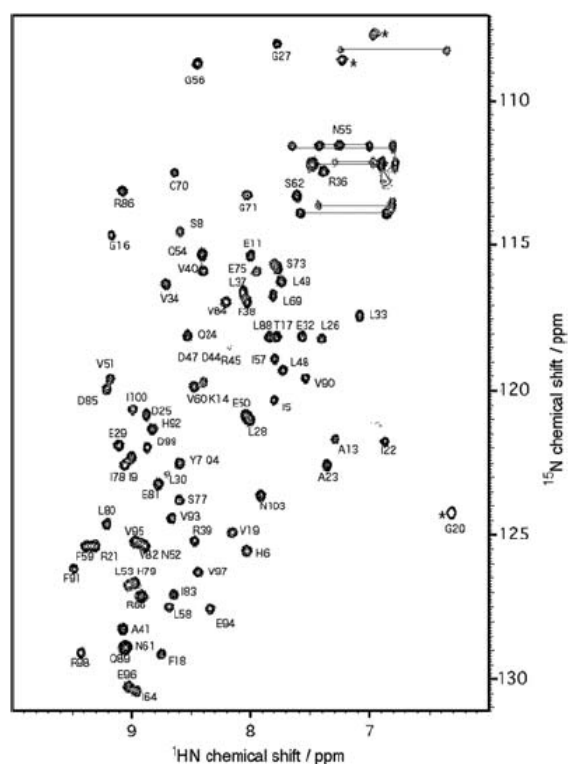


図16 帰属されたCNR/プロトカドヘリン $\alpha$ -EC1タンパク質のHSQCスペクトラム

では初めて解れたものであり、プロトカドヘリンと古典的カドヘリンとの間に構造の差異が存在することを明らかにした。この結果は、カドヘリンスーパーファミリーの接着のレパートリーが、従来の古典的カドヘリンの解析のみからは想像できないレベルで幅広いものであることを示すものであり、本構造決定は、今後の新しいカドヘリンの分子メカニズムの解明に寄与しうる。また今回明らかとなったカドヘリンスーパーファミリーの幅広い構造学的レパートリーは、高度な多様化・組織化が要求される脳神経系において、相互作用のバリエーションとして積極的に利用されている可能性がある。

## 8) ヒトにおける CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 、プロトカドヘリン $\beta$ 遺伝子クラスターにおける遺伝的多型の解析

Fyn チロシンリン酸化酵素と統合失調症との関連性が示唆された。Fyn と関連する CNR/プロトカドヘリン遺伝子クラスターは、ヒト染色体 5q31 に存在しており、複数の遺伝子家系解析において統合失調症との連鎖が認められている。CNR/プロトカドヘリン遺伝子クラスターは、多様化した分子群であり、遺伝的多型の存在が想定された。本研究では、ヒトにおける CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 、プロトカドヘリン $\beta$  遺伝子クラスターにおける遺伝的多型の解析を、健常者 104 名より、インフォームド・コンセントを得て抹消血を採取し、ゲノム DNA を精製し行った。

その結果、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  においては、同義的置換より非同義的置換が 2.2 倍であり、 $\beta$  においては 1.2 倍であった。また、この CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  での非同義的置換は、第 1 カドヘリン領域で高く、この傾向は  $\beta$  では認められなかった。48-kb に及ぶ連鎖不均衡が認められ、この領域で 15 のアミノ酸置換を見つけることができた。また、 $\alpha$  8, 9, 10 の遺伝子欠失も確認した (図 17)。連鎖不均衡と遺伝子欠失については Noonan et al. 2003 で報告されている。遺伝的多型の解析により、高頻度の位塩基置換が認められた。

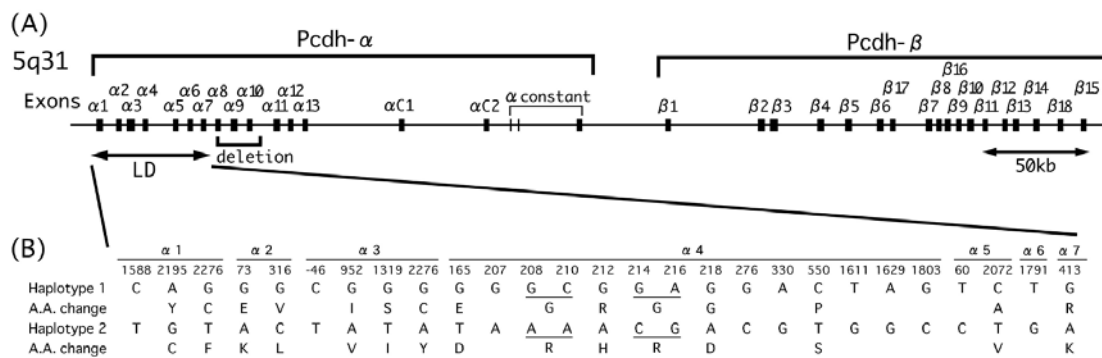


図 17 ヒト CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 、プロトカドヘリン $\beta$  遺伝子クラスターにおける遺伝的多型。連鎖不均衡によるハプロタイプでの 15 アミノ酸配列変換、遺伝子欠失が認められた。

また、この塩基置換は遺伝子配列の相同性の高いところで顕著に認められた。 $\alpha$  遺伝子クラスターにおいては、EC1, 4, 5, 6 で、 $\beta$  では EC5, 6 で配列の相同性が高い。この高い領域において、遺伝的多型の頻度が高いことが明らかとなった (図 18)。よって、 $\alpha$  と  $\beta$  では遺伝子多型の傾向が、カドヘリン領域ごとに異なる。以上の結果により、ヒトにおける 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。現在、これら遺伝的多型とヒト精神神経疾患との関連性、ヒト脳機能の多様性との関わり合いを解析している。

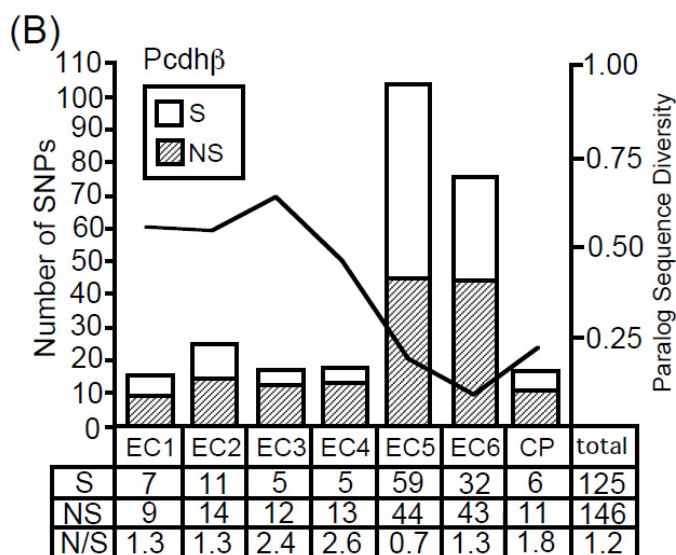
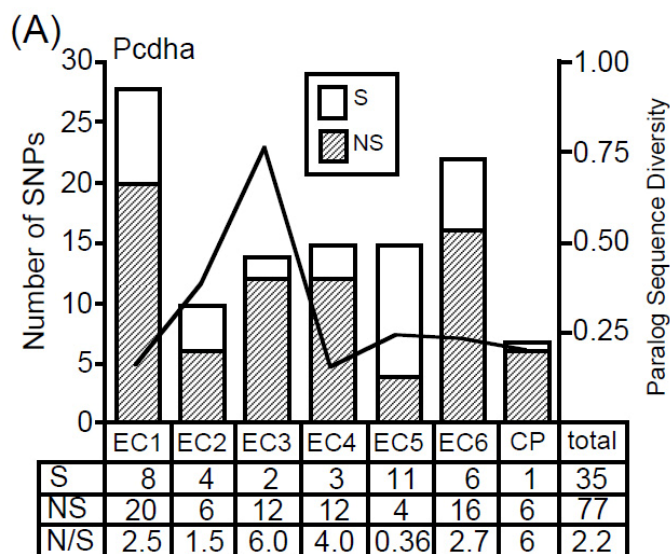


図 18 ヒト CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 、プロトカドヘリン $\beta$  遺伝子クラスターにおける遺伝子配列の相同性(多様性)と遺伝子多型との関連性。

### 9) マウス亜種間における CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 遺伝子クラスターの遺伝的多型と分子進化

多重遺伝子族にとって遺伝子変換(gene conversion)は遺伝情報を混合するための重要なメカニズムであると考えられている。CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  遺伝子ファミリーはマウス 18 番染色体に存在し、そのゲノム構造は可変領域と呼ばれる大きな第一エクソンが遺伝子クラスターを形成し、それぞれの可変領域エクソンはシグナルペプチド、6 つのカドヘリンリピート(EC1-EC6)、膜貫通領域と細胞内領域の一部をコードしている。一方、定常領域と呼ばれるゲノム下流の 3 つのエクソンは残りの細胞内領域をコードしている。本研究では、マウス(*Mus musculus*)亜種間に存在する遺伝学的多様性に着目し、これを明らかにすることでゲノム DNA、特に多重遺伝子における進化の方向性を探ることを目的としている。現在のマウスには *domesticus*, *musculus*, *castaneus*, *bactrianus* という、大きく分けて 4 つの亜種が存在し、互いに交配は可能であるが地



理的隔離によってそれぞれの亜種独自の遺伝的進化を遂げてきていることが示されている。本実験では、上記 4 亜種を含む野生由来マウス 12 系統 (JF1/Ms, MSM/Ms, SWN/Ms, KJR/Ms, CHD/Ms, BLG2/Ms, NJL/Ms, HMI/Ms, CAST/Ei, AVZ/Ms, PGN2/Ms, BFM/2Ms)、及び実験室マウス 4 系統 (C57BL/6J, BALB/cUCSD, DBA/1J, DBA/2J) の計 16 系統のゲノム DNA を用いて、マウス亜種間における CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  コーディング領域での遺伝的多型を解析し、遺伝子変換を介した DNA 協調進化のメカニズムと DNA 塩基置換の方向性の確認を試みた。

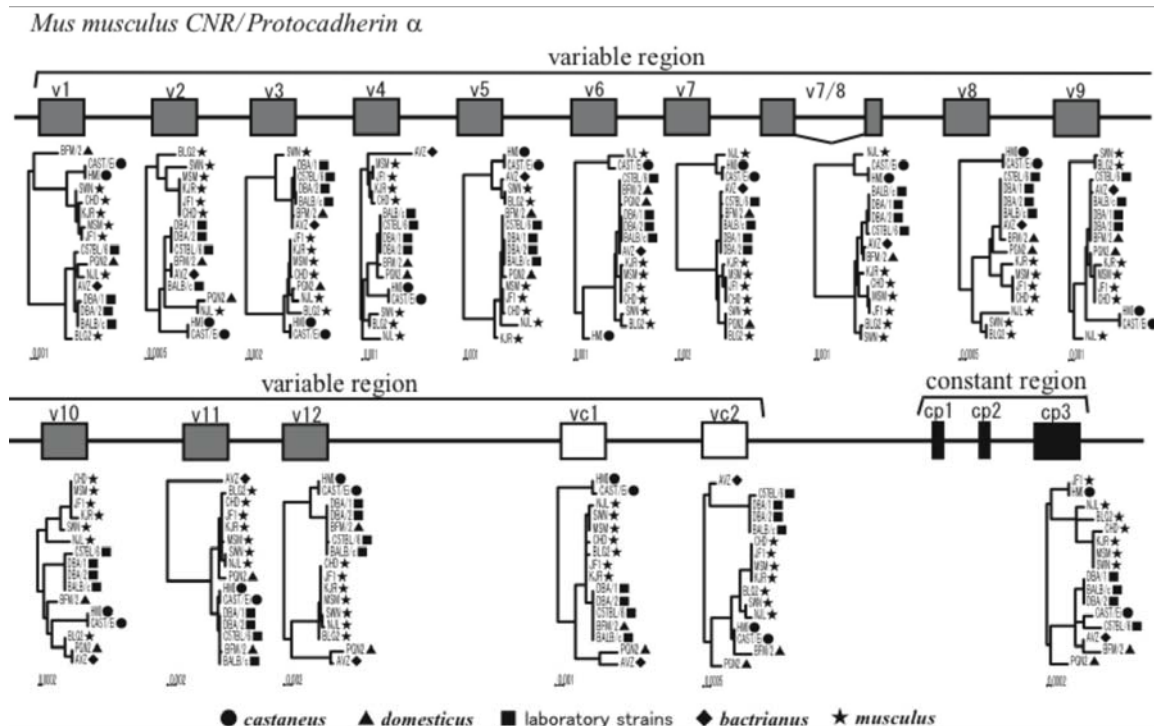


図 19 マウス CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  各エクソンにおける 16 系統間における系統学的解析。定常領域 cp1, cp2 には遺伝的多型は存在していない。

各マウス系統の CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  コーディングエクソンに対して特異的なプライマーを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物を精製後、更に産物内部に対して特異的なプライマーを用いてダイレクトシークエンスを行った。得られたシークエンスデータをアセンブリし、マウス系統毎の遺伝的多型の検出を行い、全多型データを dbSNP に登録した (ss28533130-ss28533995)。その結果、CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  全コーディング領域 (36492bp x 16 系統 = 583872bp) 中、可変領域エクソンで 889 箇所、定常領域で 3 箇所の 1 塩基置換 (cSNP)、2 箇所の 3 塩基欠失、1 箇所の 1 塩基欠失、1 箇所の 1 塩基挿入、及び 1 箇所のトランスポゾン挿入を検出した。また、全ての 1 塩基置換中、588 箇所が同義的置換、301 箇所が非同義的置換で  $K_a/K_s$  値は 0.51 であった。また、これらの遺伝的多型データを用いて CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  各エクソンについて N-J 法による系統樹を作成した結果、実験室系統 4 亜種ではエクソン v1-vc2 までは同じ挙動を示すが、エクソン cp3 では C57BL/6 のみ他の 3 亜種とは異なる位置に存在

していた(図 19)。この結果は CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  領域の可変領域と定常領域の間に遺伝的多型ブロックの境界が存在するという、Frazer らが示した結果と一致していた。

マウス亜種における遺伝的多型形成の方向性を検討するため、これらの共通祖先と考えられるラット (*Rattus norvegicus*) CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  遺伝子との比較を行った。ラットとマウスはおよそ 1000-1500 万年前に分岐したと考えられ、マウスは 100 万年前には現在の 4 つの亜種に分かれていることが示されている。本実験では、マウス亜種同一遺伝子座のアミノ酸置換を伴わないコドンの 3 番目の塩基置換に対して、ラットと同じ塩基を祖先型と仮定することで塩基置換に方向性を与えた。CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  ドメイン毎に傾向を調べた結果、EC1, EC5, 膜貫通領域でのみ AT から GC への塩基置換の方向性が確認された。これまでの研究から遺伝子変換を受けていると思われる領域ではコドン 3 番目の GC 含量 (GC3) が増加していることが示されていたが、本研究結果より、実際に遺伝子変換と GC3 増加の関連を示すことができた。

**Direction of GC3 content by domain-encoding region**

Domain-encoding Region	C57BL/6		from GC		from AT		Ratio of to GC / to AT (b+d / a+c)
	GC3 (%)	AT3 (%)	to AT (revised, a)	to CG (revised, b)	to TA (revised, c)	to GC (revised, d)	
SIGNAL	208 (56.7)	159 (43.3)	12 (0.21164)	0 (0)	0 (0)	4 (0.09237)	0.4364
EC1	1133 (81.5)	258 (18.5)	72 (0.88344)	6 (0.07362)	1 (0.05405)	17 (0.91892)	1.0587
EC2	587 (41.4)	830 (58.6)	32 (0.77295)	3 (0.07246)	7 (0.11945)	24 (0.40956)	0.5401
EC3	530 (37.8)	873 (62.2)	36 (0.95238)	5 (0.13228)	3 (0.04823)	28 (0.45016)	0.5821
EC4	863 (62.5)	517 (37.5)	44 (0.70400)	3 (0.04800)	2 (0.53333)	16 (0.42667)	0.3836
EC5	1109 (77.6)	321 (22.4)	90 (1.15979)	4 (0.05155)	7 (0.32150)	34 (1.51786)	1.0595
EC6	858 (56.8)	653 (43.2)	24 (0.42254)	6 (0.10563)	1 (0.02315)	10 (0.23148)	0.7564
TM	290 (76.9)	87 (23.1)	9 (0.11704)	3 (0.03901)	0 (0)	6 (0.25974)	2.5525
VCP	575 (60.0)	384 (40.0)	25 (0.41667)	0 (0)	0 (0)	12 (0.30000)	0.72
All Regions	6153 (60.1)	4082 (39.9)	344 (5.72379)	30 (0.49917)	21 (0.52632)	151 (3.78446)	0.6854

図 20 マウス CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  の分子進化の方向性。アイソフォームの相同性が高い領域で AT から GC への塩基置換の偏りが明らかとなった。

Frazer らの研究から、マウス CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  領域において、実験室系統間ではほとんど遺伝的多型が存在しないことが示されている。本研究の遺伝的多型データから、CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  コーディング領域において、野生由来系統と実験室系統間で遺伝的多型を生じていた領域は 14 箇所検出され、そのうち 10 箇所は同義的置換で Ka/Ks 値は 0.4 と CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  全体の結果と変わらなかったが、実験室系統 C57BL/6, DBA/1, DBA/2, BALB/c 内に存在する遺伝的多型は 13 箇所検出され、そのうち非同義置換となる SNP は 11 箇所あり、Ka/Ks 値は 5.5 と非常に高い数値となった。これらの塩基置換はおそらく実験室系統形成以前に生じたものであると考えられるが、実験室系統内では非同義置換を伴う遺伝的多型が負の選択を受けにくいことが示唆された。

次に、同義置換及び非同義置換それぞれを伴う遺伝的多型の割合を CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  各ドメイン別に調べたところ、非同義置換となる遺伝的多型は 10kb あたり 50 ~ 100 個 (平均 88.5 SNP/10kb) と全てのドメインであまり変化がなかったが、同義置換となる遺伝的多型は EC1 と EC5 領域でのみ高い頻度で見られた。また、全ての可変領域エクソンにおける EC1, EC5 及び EC2 領域の配列を用いて系統樹を作成すると、同一エクソンにおいて EC2 ではマウス亜種を超えて配列が保存されていたが、EC1, EC5 に

においてはマウス亜種間でそれぞれ異なる挙動を示した。更に実際の配列を確認すると、各亜種固有に高い相同性を持つ配列が EC1, EC5 領域で検出された。これらの結果から、マウス CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  EC1, EC5 領域では亜種特有の遺伝子変換が生じていることが示唆された。

以上の結果から、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ の EC1, EC5 領域では遺伝子変換の結果、GC3 の増加を伴った各亜種固有の配列を獲得することが明らかとなった。遺伝子重複によって生じるパラログ遺伝子とは異なり、多重遺伝子族である CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ では、可変領域遺伝子クラスター内の特定の領域でのみ遺伝子変換による分子進化が生じており、この進化は各亜種で独自に相同性が高められる協調進化も含まれていることが示唆された。

### 10)ゼブラフィッシュプロトカドヘリン遺伝子群のゲノム構造と転写産物の解析

クラスター型プロトカドヘリン遺伝子群は、マウス、ヒトで同定されている多様化した膜タンパクで、脊椎動物にのみ存在し、神経系に強く発現している事が知られている。そのゲノム構造は多数の可変領域と一つの定常領域を持つプロトカドヘリン $\alpha$ とプロトカドヘリン $\gamma$ が定常領域を持たないプロトカドヘリン $\beta$ をはさんで縦列に並んでおり、非常に多様性に富んだタンパク質群をコードしている。このような性質から、プロトカドヘリン遺伝子群は神経系の進化、複雑化に重要な働きをしている分子であると考えられ、多様な脊椎動物のプロトカドヘリン遺伝子群の研究は、神経系の多様化を知る上で重要な知見をもたらすと考えられる。

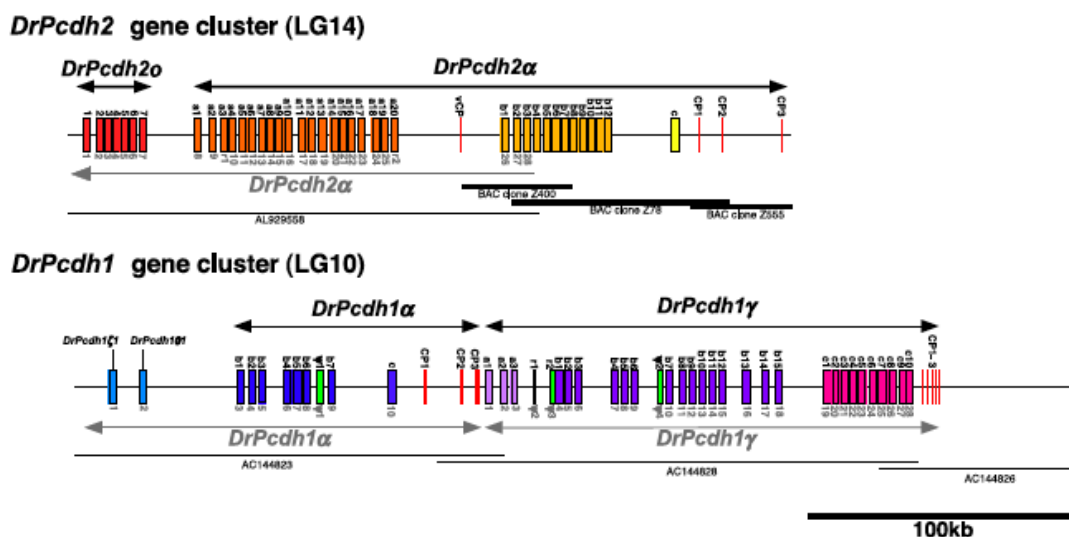


図 21 DrPcdh 遺伝子クラスターの構造。DrPcdh は多数の縦列に並んだ可変領域エクソンからなっており、色分けはそれぞれのファミリーの区分を示す。

本研究では、ゼブラフィッシュ cDNA ライブラリーから、マウス CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ の定常領域をプローブとして、ゼブラフィッシュプロトカドヘリン $\alpha$  cDNA クローンを単離した。この cDNA には、(1)細胞外領域にカドヘリンモチーフ、(2)細胞内領域に PxxP モチーフ、(3)細胞内領域の C 末端側にリジンに豊かな領域があり、哺乳類 CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ と共通した性質を持っていた。これらの特徴から、この分子をゼ

ブラフィッシュプロトカドヘリン $\alpha$ と特定した。この cDNA クローンの配列より、ゼブラフィッシュゲノム BAC クローンのスクリーニングを行い、ゼブラフィッシュゲノムのプロトカドヘリン $\alpha$ 領域を含んだ BAC クローンを 3 個単離し、これらをショットガンシーケンスする事により配列を明らかにした。また、これらの配列を BLAST サーチにかけ、データベースに登録されたゼブラフィッシュゲノム配列と統合し、ゼブラフィッシュプロトカドヘリンクラスターの全体像が明らかになった。ゼブラフィッシュプロトカドヘリン遺伝子群は 3 つのクラスターが 2 つの染色体上に存在している (図 21)。これらを DrPcdh1、DrPcdh2、DrPcdh3 クラスターとし、更に、我々が明らかにした DrPcdh2 クラスターは、DrPcdh2 $\alpha$ 、DrPcdh2 $\alpha$ a、DrPcdh2 $\alpha$ b の 3 つのファミリーに分けられた。DrPcdh1 クラスターは、主に DrPcdh1 $\alpha$  と DrPcdh1 $\gamma$  からなり、哺乳類で見ついている Pcdh $\beta$  ファミリーは存在しなかった。アミノ酸配列による系統樹解析の結果、DrPcdh $\alpha$  と DrPcdh $\gamma$  の可変領域はそれぞれ、哺乳類 Pcdh $\alpha$ 、Pcdh $\gamma$  とオルソログな関係にある事が確認された。DrPcdh2 クラスターの染色体領域を明らかにするため、Radiation hybridization 法を行ったところ、DrPcdh2 クラスターはゼブラフィッシュの LG14 上に存在する事が明らかになった。結果として、ゼブラフィッシュプロトカドヘリン遺伝子群はフグ同様 2 つの染色体上に、およそ 100 個の可変領域を持つことが明らかになった。哺乳類では 50-60 個の可変領域が存在しており、ゼブラフィッシュでは哺乳類よりもより多くのプロトカドヘリン可変領域エクソンを持つ事が明らかになった。フグ、ゼブラフィッシュなどの条鰭類においては、全ゲノム重複により、哺乳類と比較して遺伝子領域がより多く存在する事が知られているが、プロトカドヘリン遺伝子群においても、それが確認された。

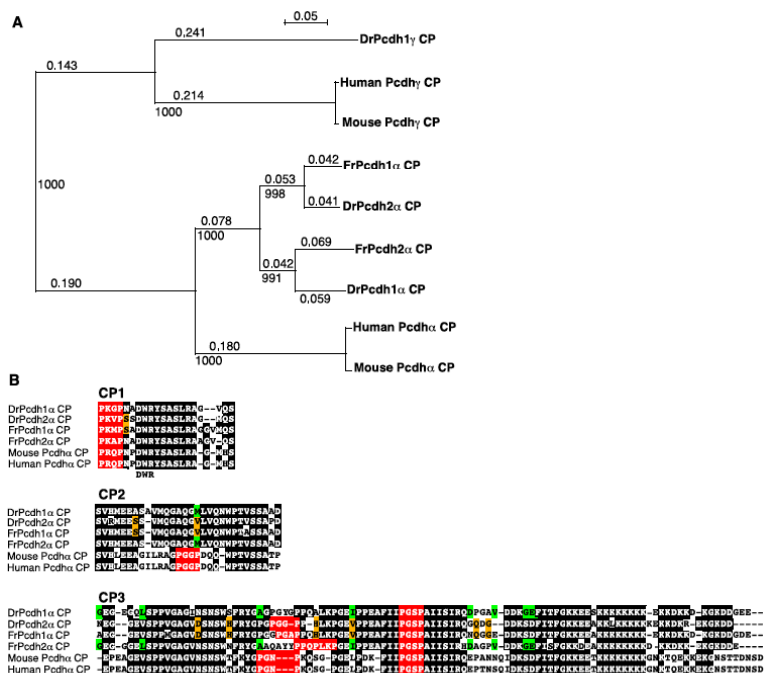


図 22 DrPcdh $\alpha$  と DrPcdh $\gamma$  の定常領域の比較。(A)ゼブラフィッシュ、フグ、マウス、ヒト Pcdh $\alpha$  と Pcdh $\gamma$  の定常領域アミノ酸配列による系統樹解析。(B)ゼブラフィッシュ、フグ、マウス、ヒト Pcdh $\alpha$  の定常領域のアミノ酸配列アライメント。SH3 結合ドメインである PXXP モチーフを赤で示した。保存されたアミノ酸は黒で示している。

本研究では、フグゲノムにおいてもゼブラフィッシュ同様、プロトカドヘリン $\alpha$ 領域が二つ存在する事を明らかにしており、これらにマウス、ヒトのプロトカドヘリン $\alpha$ を加えて、定常領域アミノ酸配列の比較を行った。その結果、フグ(Fr)Pcdh1 $\alpha$ はDrPcdh2 $\alpha$ と、FrPcdh2 $\alpha$ はDrPcdh1 $\alpha$ とオルソログスな関係にある事が分かった(図22A)。また、どちらのプロトカドヘリン $\alpha$ もヒト、マウスプロトカドヘリン $\alpha$ と同じ分岐に属し、ここでもオルソログスな関係がみられた。DrPcdh $\gamma$ に関しても、ヒト、マウスプロトカドヘリン $\gamma$ とオルソログスな関係が見られ、プロトカドヘリンファミリーの定常領域は脊椎動物内で保存されている事が明らかになった。プロトカドヘリン $\alpha$ の共通領域エキソンはCP1、CP2、CP3の3つに分かれており、CP1とCP3領域には、脊椎動物間で共通してPXXPのアミノ酸モチーフが保存されていた(図22B)。PXXPモチーフは細胞内シグナル伝達物質に多く見られるSH3結合ドメインとして知られており、細胞内シグナル伝達に重要な役割を持つ事が考えられる。CP2領域にはフグとゼブラフィッシュではPXXPモチーフは見られなかった。プロトカドヘリン $\gamma$ には、哺乳類にも、魚類にもPXXPモチーフは見られず、PXXPモチーフはプロトカドヘリン $\alpha$ ファミリーに特有の性質である事が考えられる。

プロトカドヘリン $\alpha$ の可変領域のアミノ酸配列を用いた系統樹解析の結果、DrPcdh2 $\alpha$ bファミリーの可変領域エキソンは、細胞外領域に6個のカドヘリンリピートを持ち、膜貫通領域、細胞内領域の一部をコードしている事が明らかになった。DrPcdh2 $\alpha$ cはマウスPcdh $\alpha$ c2とオルソログスな関係が見られた。Pcdh $\alpha$ 1から12においては、ゼブラフィッシュとマウスの種間よりも、それぞれの種内でより保存された関係にあった。遺伝子クラスター構造をもつ遺伝子群においては、遺伝子相同組み換えや遺伝子交換等の仕組みにより、配列の均一化(sequence homogenization)が起こることが知られており、ほ乳類と魚類の間で、配列の均一化が起こることで、協調進化をしていることが明らかになった。

DrPcdh2 $\alpha$ とマウスPcdh $\alpha$ の可変領域のアミノ酸配列アライメントの解析の結果、マウス、ヒトCNR/プロトカドヘリン $\alpha$ ではEC1領域が高度に保存されているが、DrPcdh $\alpha$ においては、EC1領域は各可変領域間での保存性は低かった。また、マウス、ヒトで見られ、 $\beta$ 1インテグリンとの結合が知られているRGDモチーフはDrPcdh $\alpha$ には見られず、DrPcdh $\alpha$ はヒト、マウスとは異なる機能がある可能性が考えられた。マウスとゼブラフィッシュ間でカドヘリンリピートの特徴的な配列として知られるアミノ酸配列は高度に保存されていた。EC4以降のC末端側の配列は、マウス、ゼブラフィッシュそれぞれの種内では高度に保存されていたが、種間では異なっている事が明らかとなった。

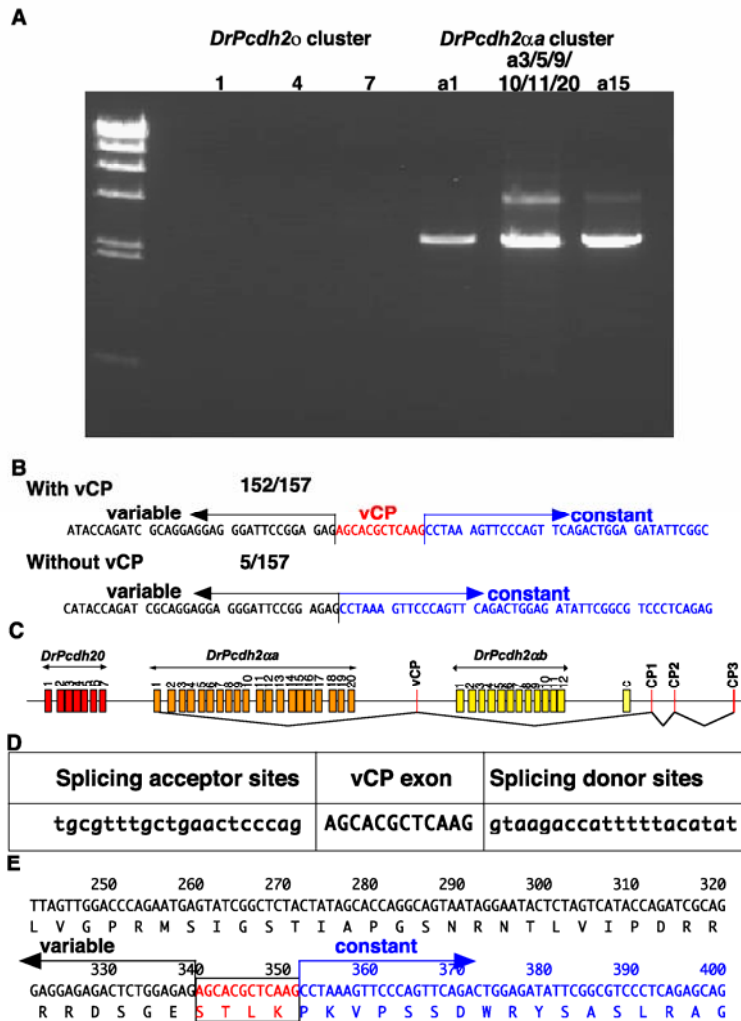


図 23 DrPcdh $\alpha$ a の転写産物。  
 (A) DrPcdh $2\alpha$ o、DrPcdh $2\alpha$ a プライマーと、DrPcdh $2\alpha$ b 定常領域のプライマーによる RT-PCR。DrPcdh $2\alpha$ o のプライマーではいずれも増幅が見られなかったが、DrPcdh $2\alpha$ a のプライマーでは全てで増幅が見られた。(B) シーケンス解析の結果、ほとんどの DrPcdh $2\alpha$ a 転写産物には可変領域と定常領域の間に 12bp の挿入(vCP)が見られた。(C) DrPcdh $2\alpha$ a 転写産物のスプライシングの例。(D) vCP エキシソンの配列とスプライシングサイトの配列。(E) vCP の挿入によって、DrPcdh $2\alpha$ a と定常領域の間には 4 アミノ酸が挿入される。

マウス CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  においては可変領域と 3' 末端側エキソンのスプライシングの違いにより、A 型、B 型、O 型のスプライシングフォームがある事が知られている。DrPcdh $2\alpha$  においては、A 型、O 型の転写産物は認められたが、B 型の転写産物は見られなかった。また、RT-PCR 産物のシーケンス解析から、これら以外の短い転写産物が得られた。これらの短い転写産物は、古典的スプライシングサイトである GU-AG の規則に従ったスプライシングをしているものと、スプライシング規則によらない、数塩基のリピート配列を両端に持つものがあった。これらの短い転写産物は EC1 領域と細胞内領域は共通して保持しているが、共通して膜貫通領域を欠損しており、細胞外に分泌される可能性も考えられた。

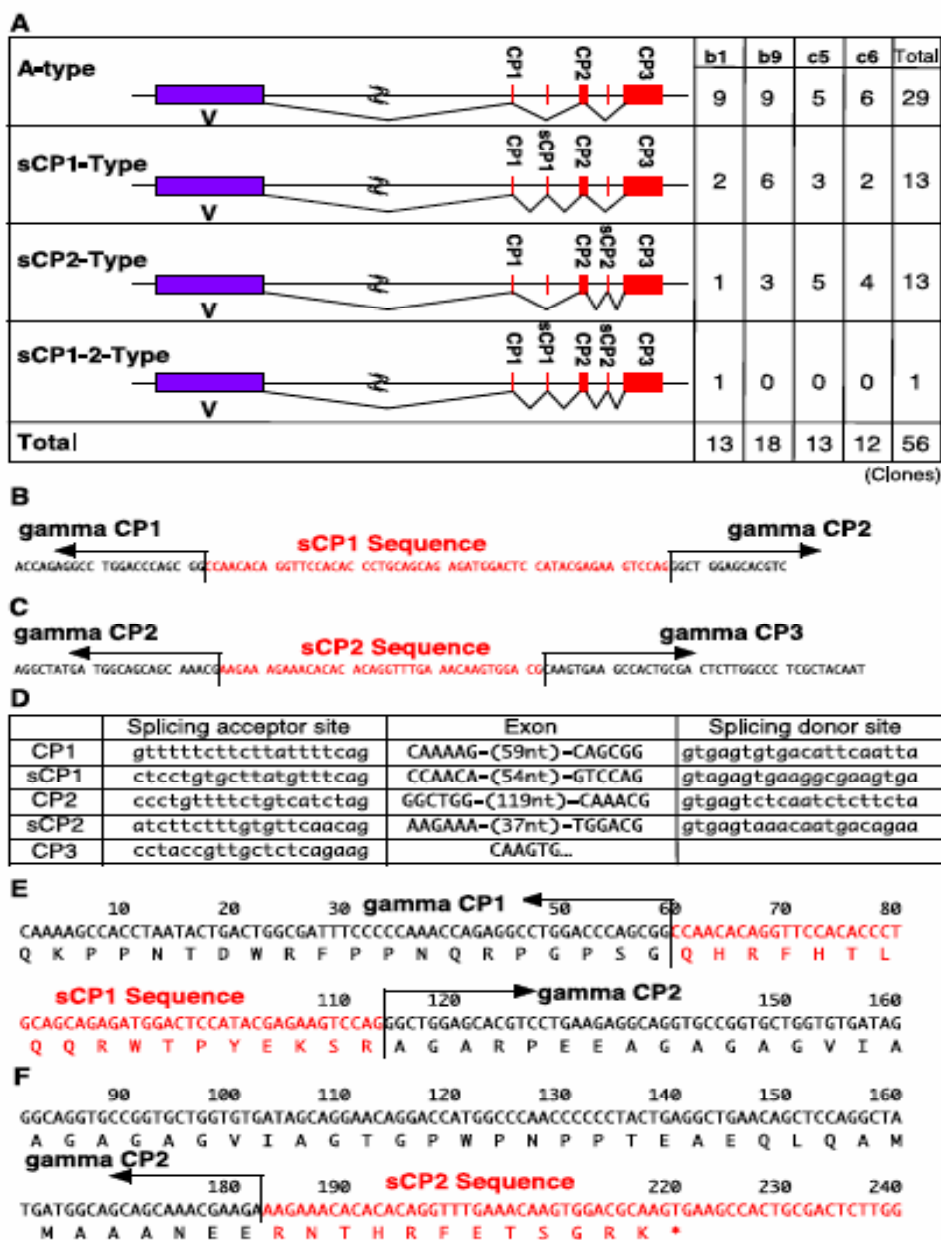


図 24 DrPcdh1 $\gamma$  の転写産物。(A)DrPcdh1 $\gamma$  のスプライシングパターンと、DrPcdh1 $\gamma$  b1、b9、c5、c6 の転写産物のシーケンス解析の結果。転写産物の 1/2 は A 型、1/4 を sCP1 型と sCP2 型がそれぞれ占める。(B) sCP1 型の配列。(C) sCP2 型の配列。(D) 各定常領域エキソンのスプライシングサイト。(E) sCP1 配列とアミノ酸配列。(F) sCP2 配列とアミノ酸配列

ゲノム上において、DrPcdh2 $\alpha$  b 遺伝子クラスターの上流には DrPcdh2o と DrPcdh2 $\alpha$  a クラスターが存在しており、このような遺伝子構造から、DrPcdh2o と DrPcdh2 $\alpha$  a の可変領域も DrPcdh2 $\alpha$  b 遺伝子クラスターの下流に存在する共通領域へのスプライシングを行なう事が考えられた。DrPcdh2 $\alpha$  共通領域プライマーとそれぞれ 3 種類の DrPcdh2o と DrPcdh2 $\alpha$  a の可変領域のプライマーを用いて RT-PCR を行って検証した結果、DrPcdh2o のプライマーを用いた PCR では増幅は得られなかったが、DrPcdh2 $\alpha$  a のプライマーを用いた PCR ではいずれも増幅が見られた(図 23A)。これらの増幅産物のシーケンス解析の結果、97%のサンプルにおいて、DrPcdh2 $\alpha$  a の可変領域と定常領域の間に 12bp の塩基配列が挿入されており、これは STLK の 4 アミノ酸をコードしていた(図 23B, E)。この 12bp の塩基は、ゲノム上の DrPcdh2 $\alpha$  a クラスターと DrPcdh2 $\alpha$  b クラスターの間コードされているエキソンで、vCP エキソンと名付けた(図 23C)。これらの

転写産物の解析結果から、DrPcdh2 のクラスターは DrPcdh2o と DrPcdh2 $\alpha$  a と DrPcdh2 $\alpha$  b と DrPcdh2 $\alpha$  c の各ファミリーに分類された。DrPcdh1 $\alpha$  では、DrPcdh1 $\alpha$  b の上流には DrPcdh1 $\alpha$  a クラスターも vCP エキソンも存在せず、定常領域にはスプライシングをしない、DrPcdh1vo1 と DrPcdh1z1 と名付けた二つのエキソンが存在した。

DrPcdh2 $\alpha$  クラスターに加えて、DrPcdh1 $\gamma$  の転写産物においても択一的スプライシングフォームが見つかった(図 24)。RT-PCR 産物のシーケンス解析の結果、56 クローン中の 28 クローンはマウス Pcdh $\gamma$  同様、CP1、CP2、CP3 の共通領域エキソンをそのまま使っていたが、13 クローンが CP1 と CP2 の間に存在するエキソンである sCP1 を挿入しており、更に 13 クローンは CP2 と CP3 の間に存在する sCP2 エキソンを挿入していた。CP1、sCP1、CP2、sCP2、CP3 の全エキソンを持った転写産物は 56 クローン中、1 個だけだった(図 24A)。sCP1 エキソンは 54bp をコードしており、18 アミノ酸を挿入する(図 24B, E)。sCP2 は 37bp をコードしており、コドン読み枠のずれにより CP3 に入ったところで終止コドンが現れる。このような転写産物は哺乳類プロトカドヘリン $\gamma$  には見られないものであった(図 24C, F)。

結果として、ゼブラフィッシュは哺乳類より多くのプロトカドヘリン遺伝子クラスターを持ち、多くの可変領域を持ち、多くの択一的スプライシングによるバリエーションが存在していることが明らかになった。多くの遺伝子クラスターや、エキソンを持っていることは、発生期の形態形成に重要な Hox 遺伝子群にもみられ、ゼブラフィッシュでは哺乳類と比較してより多くの遺伝子をもち、多様化している現象と一致していた。以上のように、プロトカドヘリン遺伝子群のような、多様化し、神経で発現する遺伝子群の系統進化的解析により、脳の機能と形態の進化を考える上で非常に興味深い結果が得られた。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

このように本研究において、CNR/プロトカドヘリンのゲノム構造、タンパク質構造、脳の多様性との関係について基礎的データと考え方がまとまった。今後は、これらの知見をもとに CNR/プロトカドヘリンの多様性と脳機能との関連性について迫る必要がある。現在までに、遺伝子変換マウスの作製と解析も進み、CNR/プロトカドヘリンが神経回路形成や脳機能制御に関わっていることも明らかとなった。また、ヒト精神神経疾患との関わり合いについても、CNR/プロトカドヘリン、Fyn との関連性を明らかにできつつあり、今後は CNR/プロトカドヘリンのゲノム構造と機能をもとにした脳研究の推進が期待できる。また、神経細胞の多様性と CNR/プロトカドヘリンの遺伝子発現制御との関連性についての興味深い知見が得られたことより、脳神経系において神経細胞多様化をもたらす新たな分子メカニズムへのアプローチが可能となったと考えている。莫大な細胞の多様性を生み出し、組織化する免疫系に類似した脳神経系における新たな分子メカニズムが、CNR/プロトカドヘリンの研究より生み出されると予想している。



### 3. 2 クラスター型カドヘリンのゲノム構造解析(慶應義塾大学グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

脳の構造や機能は脊椎動物種間で多様化していることが知られている。このことから脳の構造を規定する遺伝情報は進化の過程で様々に変化を遂げてきたことが示唆される。CNR/プロトカドヘリン遺伝子ファミリー(CNR/Pcdh $\alpha$ 、Pcdh $\beta$ 、Pcdh $\gamma$ 、Pcdh $\delta$ 、Pcdh $\zeta$ )は脳神経系で発現する細胞間接着分子であり、複雑な脳神経回路網の形成に重要な役割を果たしていると考えられている。そのゲノム構造は免疫グロブリンや T 細胞受容体遺伝子と類似した遺伝子クラスターを形成している。特に CNR/Pcdh $\alpha$ は、インテグリンと結合することや、学習・情動行動の形成に関わる Fyn と結合することなどから、脊椎動物種の脳の進化的多様性をもたらした有力な候補遺伝子と考えられており、脊椎動物種間による CNR/Pcdh $\alpha$ 遺伝子構造の変化が注目されている。本研究では様々な脊椎動物の CNR/Pcdh 領域の塩基配列を決定して比較ゲノム解析を行ない、CNR/Pcdh 遺伝子クラスターがどのように進化してきたかを明らかにすると共に、動物種ごとの脳の構造や機能の多様化が CNR/Pcdh 遺伝子クラスターの遺伝情報の差異とどのように関連しているかを考察する目的で以下の研究を行った。論文投稿中。

#### 1) カエル、イルカのゲノム BAC ライブラリーの作製

CNR/Pcdh 遺伝子クラスター領域は数百 kb におよぶことが予想されるため、その全領域をカバーするためには BAC クローンが不可欠である。我々は本研究開始以前にヒトをはじめとして各種の脊椎動物の BAC ライブラリーを構築していたが、本研究では新たに両生類のアフリカツメガエル(*Xenopus tropicalis*)及び、霊長類に匹敵する高度な知能をもつバンドウイルカ(*Tursiops truncatus*)の BAC ライブラリーの構築を行った。

アフリカツメガエル BAC ライブラリーの平均インサートサイズは 100kb であり 10 万クローンを 384 穴マイクロタイタープレートに個別に保存した。アフリカツメガエルのゲノムサイズは約 1700Mb であることから、構築した BAC ライブラリーは、カエルゲノムの約 6 倍をカバーしていると考えられる。一方、イルカ BAC ライブラリーの平均インサートサイズは 106kb であり 12 万クローンを個別に保存した。イルカのゲノムサイズは約 3,000Mb と推定されることから、本研究で構築したイルカ BAC ライブラリーはイルカゲノムを約 4 倍カバーしていると考えられる。

どちらの BAC ライブラリーに対してもコロニーハイブリダイゼーション法によって迅速に目的遺伝子をスクリーニングするため、高密度レプリカフィルターを作製した。

#### 2) CNR/Pcdh 領域をカバーする BAC クローンの単離

本研究で BAC ライブラリーを構築したカエル、イルカに加え、我々が既に BAC を構築していたメダカ、ニワトリの BAC ライブラリーから CNR/Pcdh 領域をカバーする BAC クローンをスクリーニングした。イルカ、ニワトリについては CNR/Pcdh $\alpha$ クラスターをカバーする BAC クローンを得た。カエルについては一部を残して CNR/Pcdh 全領域を概ねカバーする BAC クローンを得た。メダカに関しては CNR/Pcdh 全領域をカバーする

BAC クローンを得ることができた。

### 3) CNR/Pcdh 遺伝子クラスターのゲノム構造の決定

ニワトリ CNR/Pcdh BAC クローンは八木グループが行った。我々はメダカ CNR/Pcdh 遺伝子クラスター領域をカバーする BAC クローンから 5 クローンを選んでショットガンシーケンシングを行い、約 650kb の塩基配列を決定した。ヒト、マウスとの比較解析の結果、メダカ CNR/Pcdh 遺伝子クラスター領域には、CNR/Pcdh $\alpha$ 、Pcdh $\gamma$ が見い出されたが、ヒト、マウス Pcdh $\beta$ 遺伝子クラスターに対応する相同遺伝子は存在しなかった。しかし新たなカドヘリン様遺伝子クラスターが存在することが分かり、Pcdh $\delta$ 遺伝子ファミリー(7 個)と名付けた。Pcdh $\delta$ 遺伝子ファミリーはヒト、マウスには存在せず、魚類特有であると考えられた。更にカエルやニワトリの CNR/Pcdh 各遺伝子との系統樹解析によって新たに Pcdh $\zeta$ ファミリー(1 個)を見い出した。これらの結果、メダカ CNR/Pcdh 領域には 102 個の遺伝子(V exon)が存在することを明らかにし、その全構造を決定することができた。メダカの遺伝子数はヒト(53 個)、マウス(58 個)の約 2 倍であった。更にメダカの CNR/Pcdh $\alpha$ にはインテグリン結合配列(RGD)を持つ遺伝子は存在しないことが判った。このようにメダカ特有の分子進化が起きていることが認められた。以上の結果から、魚類では哺乳類とは異なる独自の CNR/Pcdh 遺伝子クラスターの分子進化が生じていることが判った。

カエル CNR/Pcdh 遺伝子クラスター領域については、作製した BAC ライブラリーから CNR/Pcdh $\alpha$ 、Pcdh $\gamma$ 遺伝子をプローブとして BAC クローンをスクリーニングし CNR/Pcdh 領域をカバーする BAC クローンを多数単離した。更にそれらの BAC コンティグの作成を進めたが、ソースとした *X. tropicalis* 個体の相同染色体間に多型があること、また後に判明したことであるが、Pcdh $\gamma$ 遺伝子クラスターが 2 クラスターあることなどのため、コンティグの作成はかなり難作業であった。我々は 8 個の BAC クローン、のべ 740kb の塩基配列を決定すると共に、我々の解析と同時期に公開された米国の研究グループによる Whole genome shotgun シーケンスデータも活用して、*X. tropicalis* の CNR/Pcdh 領域の構造を概ね明らかにすることができた。その結果、*X. tropicalis* の CNR/Pcdh 領域は CNR/Pcdh $\alpha$ が 1 クラスター(>14 個)、Pcdh $\gamma$ が 2 クラスター(>51 個、>42 個)、Pcdh $\zeta$ が 2 クラスター(各 1 個)、のべ 109 個以上の遺伝子から構成されていることが判った。

イルカについては CNR/Pcdh $\alpha$ 領域及び Pcdh $\beta$ の一部を含む 340kb(のべ 441kb)の塩基配列決定を行った。その結果、12 個の CNR/Pcdh $\alpha$ 遺伝子及び、3 個の CNR/Pcdh $\alpha$ 偽遺伝子を見い出した。また Pcdh $\beta$ 領域から見い出した遺伝子 3 個は全て Pcdh $\beta$ 偽遺伝子であった。

### 4) CNR/Pcdh 遺伝子クラスターの比較ゲノム解析

我々は更にこれらの CNR/Pcdh 領域の遺伝子/クラスター構造をヒト、マウス、ニワトリ、カエル、シーラカンス、ゼブラフィッシュ、メダカで比較した。更にこれらの生物の CNR/Pcdh 全遺伝子を対象にして、包括的な系統樹解析を行った。その結果、最も始原的な CNR/Pcdh 遺伝子から上記生物の共通祖先における CNR/Pcdh 領域の遺伝子構造に至るまでの過程を推定することができた。更に共通祖先における CNR/Pcdh から

それぞれの生物の系統でどのように CNR/Pcdh の遺伝子構造が進化してきたかを明らかにすることができた。

以上、メダカ、カエルの CNR/Pcdh 遺伝子構造の決定と脊椎動物 CNR/Pcdh 遺伝子構造の進化的解析に関する成果は論文投稿中である。イルカについての成果は論文準備中である。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

メダカは現在、ゼブラフィッシュを凌ぐ重要なモデル生物として注目されており、ヒト疾患モデルとしても活用され始めてきている。メダカの CNR/Pcdh 遺伝子の塩基配列データは *in situ* ハイブリダイゼーション法や免疫組織学的解析による CNR/Pcdh の発現解析やモルフォリノアンチセンスオリゴを用いた CNR/Pcdh 遺伝子のノックダウン解析などの機能解析にとって不可欠である。また *X. tropicalis* は *X. laevis* に代わる両生類のモデル生物として注目されてきているが、我々の成果は両生類においても CNR/Pcdh の機能解析を加速するものである。またイルカを含めた様々な哺乳類の CNR/Pcdh のデータを蓄積することによって、それぞれの生物種に特異的な脳の構造との関連を一層詳しく調べることができると期待される。

各動物種の CNR/Pcdh 遺伝子クラスター領域を含む BAC クローン DNA は、異種間の遺伝子導入に活用できる。異種間で CNR/Pcdh 遺伝子導入や置換を行なうことによって、CNR/Pcdh と脳の構造や機能の多様化の因果関係をよりダイレクトに解明でき、脳研究に計り知れないインパクトを与えると期待される。

## 3. 3 神経細胞核クローンマウスの作製と解析

(ハワイ大学グループと大阪大学グループ)

### (1) 研究実施内容及び成果

核移植によるクローニング技術を用いてマウス胎仔期神経細胞の全能性の解析を行った。大脳皮質を未分化細胞層と分化直後の細胞層に分離して、各層の細胞群をドナーとして核移植を行い、両者の個体発生能を比較した。未分化層由来のクローン胎仔は半数が正常な発生能を示したのに対し、分化した層由来では、ほとんどの胎仔が発生遅延、形態異常を起こし、最終的な産仔率も分化した層では有意に低率であった。神経が分化していく過程で神経細胞の持つ発生能(全能性)に明らかな変化が生じることを明らかにすることができた。

### 1) 核移植によるマウス大脳皮質神経細胞の全能性の解析

1998 年に体細胞由来のクローンマウス誕生が報告されて以来、クローン ES 細胞の樹立、初期化に伴うエピジェネティックな現象の解析、遺伝子発現の比較など、新しい知見が明らかにされている。体細胞の分化過程で、核の情報が変換される系として免疫系がある。この系の DNA 変換は、免疫細胞の多様性を生み、抗原(病原菌)に対する獲得的(経験的)な免疫反応系と記憶をもたらす。一方、脳神経系は、多様な細胞種よ

り成立し、獲得的記憶メカニズムが存在することにより、免疫系と類似した各情報の変換系があると指摘されてきた。近年、DNA のつなぎ換えをする DNA 修復酵素を欠損したマウスでは、免疫系のみならず神経系でも異常が起こることが示された。また、シナプスに存在するカドヘリン型受容体 (CNR: cadherin-related neuronal receptor) のゲノム構造が免疫グロブリンや T 細胞受容体のそれと類似すること、この CNR ファミリーが体細胞レベルで遺伝的変異を蓄積すること、などが明らかとなり、神経細胞が分化するに従い核の情報変換を起こす可能性が大きくなってきた。本研究では、分化前後の神経細胞核からクローン作製を試み、分化過程における全能性を解析した。

胎生 15.5 ~ 17.5 日齢のマウス大脳皮質を未分化層と分化層に二分割し、各層から分離した神経細胞をドナー細胞として核移植を行った。核移植法は、レシピエントとなる未受精卵の核をガラスピペットであらかじめ除去しておき、次いでドナー細胞核を直接、除核未受精卵の中に注入して再構築胚を作製するホノルルテクニックで行った。再構築胚に塩化ストロンチウムで人為的に活性化刺激を加えると、擬似前核を形成し、受精卵のように卵割を開始する。CZB 培地にて 3 日間培養し、桑実胚・胚盤胞期に発生したクローン胚を仮親マウスに移植した。その後、妊娠中期 (胎生 10.5 日齢) か産仔の段階で取り出し、クローン個体への発生能力を比較・検討した。

ドナー細胞の種類	再構築胚数	活性化胚数 (%)	桑実胚胚盤胞	移植胚数	10 日目の胎仔数 (%)		生存産仔数 (%)
					総数	正常	
V 層 (未分化)	69	68 (98.6)	26 (37.7)	26	9 (13.0)	4 (5.8)	-
P 層 (分化)	412	386 (93.7)	113 (27.4)	113	21 (5.1)	1 (0.2)	-
V 層 (未分化)	117	106 (90.6)	42 (35.9)	42	-	-	5 (4.3)
P 層 (分化)	182	175 (96.2)	42 (23.1)	42	-	-	1 (0.5)

図 25 未分化及び分化した神経細胞由来クローン胚の発生能の比較

(a)胎生 15.5 日齢の胎仔の大脳皮質全体から分離した細胞群をドナーとして核移植を行い、クローン産仔への発生能を調べた。その結果、再構築胚の 5.5%が成体クローンマウスになった。この成功率は、これまでに報告されている、卵丘細胞 (1.2-1.3%)、繊維芽細胞 (0.5%)、セルトリ細胞 (1.9%)、ES 細胞 (2.4-3.0%) などのドナー核の中で最も高率である。この結果は、分化初期の神経細胞核は全能性を維持していること、ドナー核として最も有効であることを示している。

(b)胎生 15.5-17.5 日齢の胎仔の大脳皮質を、未分化な神経細胞層 (脳質側: V) と分化した神経細胞層 (皮質盤: P) の二層に切り分け (図 26)、各層由来の細胞群をドナーとして核移植を行い、妊娠中期 (10.5 日齢) までの発生能を検討した。ドナー細胞を採取した各神経細胞層は、未分化な神経細胞のマーカーである nestin 陽性群と分化直後のマーカーである Hu 陽性群としておおまかに分離される。その結果、V 層由来では再構築胚の 13% (9 匹) がクローン胎仔に発生し、その半数 (4 匹) は形態的に正常であった (図 27)。一方、P 層由来では再構築胚の 5.1% (21 匹) がクローン胎仔に発生したが、

ほとんど全ての胎仔(20匹)が何らかの発生異常を示し、正常な胎仔への発生率はわずか0.2%であった(図25及び図27)。更に組織学的に解析した結果、P層由来のクローン胎仔では、波状の神経管、大脳管腔への神経上皮の隆起、崩壊した精髓管腔など、神経系での異常が多く見られた(図28)。

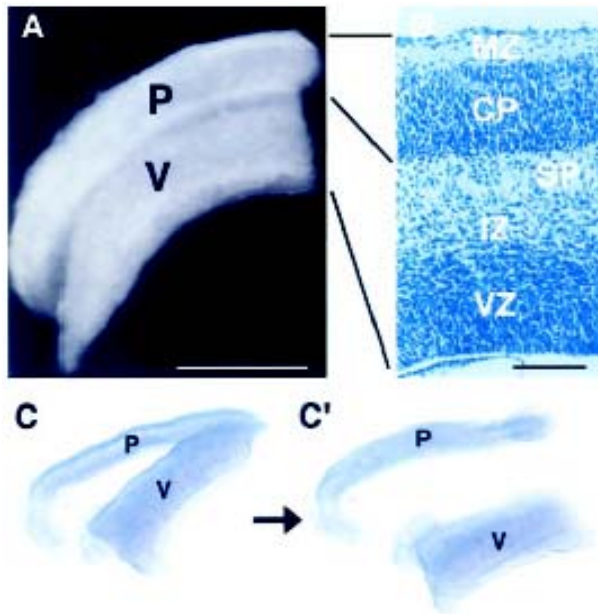


図26 胎仔期大脳皮質の区分。大脳皮質は発生過程で脳室側細胞層(VZ)、中間層(IZ)、皮質盤(CP)、辺縁層(MZ)の四層に区分される。VZ層で細胞分裂が起こり、未分化状態を脱した細胞はその上層のIZへ成長しながら移動し、より分化を進めて移動を終えた神経細胞はMZ層に蓄積されていく。A:大脳皮質は皮質(P)層と脳室(V)層に大きく分かれる。B:P層はMZとCPを含む。多くが分化した神経細胞である。V層はサブプレート(SP)、IZ、VZを含む。

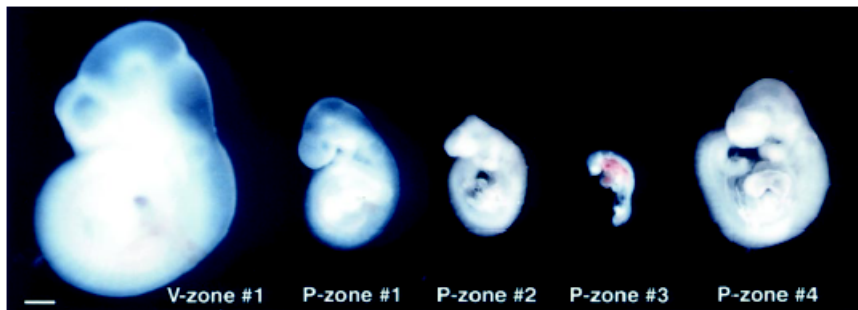


図27 神経細胞由来クローン胎仔

左(V-Zone #1)は正常な胎仔。P-Zone #1~4はP層由来の胎仔。P層由来クローン胎仔はほとんどが、発生遅延(P-Zone #1~4)、心臓肥大(P-Zone #3)、神経管の歪み(P-Zone #1~4)などの異常を示していた。

(c) 15.5-17.5 日齢胎仔のV及びP層由来神経細胞から作製したクローン胚の産仔への発生能を比較した。V層由来では再構築胚の4.3%(5匹)が産仔へ発生し、高い成功率を示した(図25)。また、5匹全てが妊性を持つ正常な成体に成長した。これに対して、P層からはわずか1.1%(2匹)が産仔になったが、うち1匹は生後まもなく死亡した。生き残った1匹(0.5%)は妊性のある成体クローンマウスになった(図25)。

以上の結果から、マウス胎仔期の神経細胞は、神経細胞の分化過程で速やかに核の全能性を失うことが示唆された。全能性の消失は、神経細胞核で何らかのゲノム交換が起こったことに原因がある可能性も考えられる。

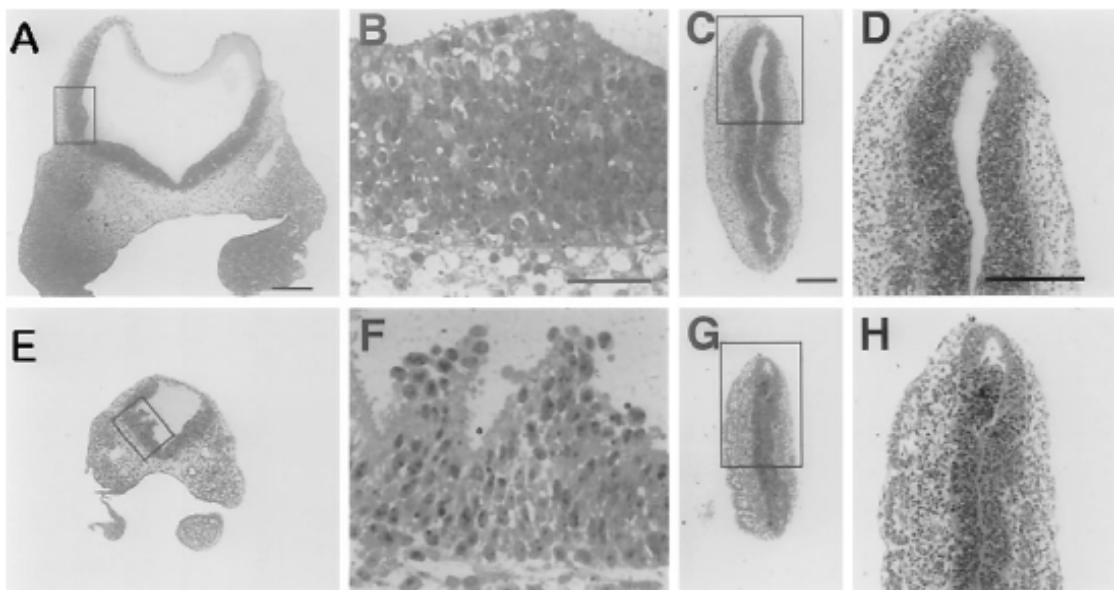


図 28 神経細胞由来クローン胎仔の組織学的解析。A-D: V層由来正常胎仔。  
E-H: P層由来異常胎仔。A, B, E, F: 第4脳室の切片像とその拡大。  
C, D, G, H: 神経管の切片像とその拡大。V層由来クローンでの規則正しい細胞層の構築に対し(A-D)、P層由来クローンの神経組織で不規則な配列(E, F)や歪み(G, H)が観察された。

## 2)クローンマウス作製による分化神経細胞核における核情報変換の解析

脳神経系と免疫系は構成する細胞種が多様化している点、多くの細胞死が認められる点、高度に組織化されている点から類似性が指摘されている。近年、DNA修復酵素であるDNA ligase IV、XRCC4、及びXRCC2欠損マウスにおいて神経細胞分化過程で異常が生じ、細胞死が頻繁に観察されていることから、神経細胞分化過程における染色体DNAレベルでの遺伝的変化の可能性が強く示唆されてきている。免疫系では、単一免疫細胞由来の細胞株を用いた解析により、DNAレベルでの遺伝的変化が確認されていることから、分化した神経核での多様化した遺伝的変換を証明するためには、神経細胞核の個々のDNAを解析する必要があるが、分化した神経細胞は細胞分裂能がなく細胞株を用いた解析が困難である。胎生15.5日から17.5日目のマウス大脳皮質由来の神経細胞核を用いた本研究において、我々は神経細胞核クローンマウス作製に成功した。

しかし、胎生期マウスの分化神経細胞核クローン胎仔の神経発生に異常が認められたことから、分化した神経細胞の核の遺伝情報には、正常な神経発生に必要な全能性が失われている可能性を示した。そこで本研究では、個体発達に伴う神経細胞核の遺伝情報の変化を解析することを目的として、生後 0-4 日齢のマウス大脳皮質の分化した神経細胞核由来のクローンマウスの作製を試みた。

Development of enucleated oocytes receiving nuclei of cerebral neurons from postnatal mice, examined on 10.5 dpc of development

Donor cells	No. of reconstructed oocytes	No. (%) of 2-cell embryos	No. (%) of molurae/ blastocysts	No. of embryos transferred	Total no. (%) of fetuses	No. (%) of apparently normal fetuses
Neurons	423	307 (72.6)	-	295	22 (7.5)	2 (0.7)
	971	593 (61.1)	237 (24.4)	231	18 (7.8)	0 (0)
	1394	900 (64.6)	-	526	40 (7.6)	2 (0.2)
Cumulus cells	105	87 (82.9)	-	87	5 (5.7)	3 (3.4)
	2947	1449 (49.2)	1434 (48.6)	1425	4 (0.3)	4 (0.3)
	3052	1536 (50.3)	-	1512	9 (0.6)	7 (0.5)

図 29 神経細胞核をもちいたクローンマウス胚の異常

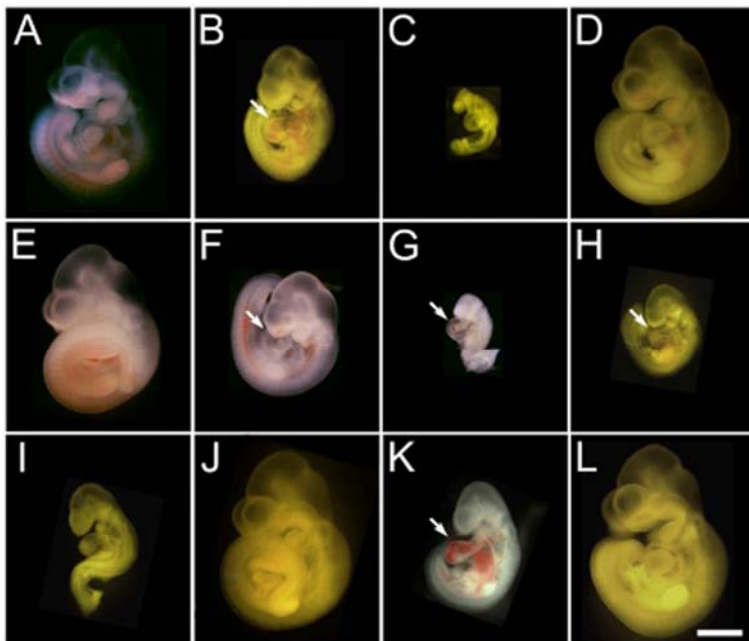


図 30 P0からP4のマウス大脳皮質由来の分化神経細胞核クローン胎仔 A から I は胎生 10.5 日目分化神経細胞核クローン胎仔、J と K は胎生 10.5 日目野生型 B6D2F1 胎仔を示している。形態学的特徴(表. 2 の検査項目)から、A、E、J、L を正常な胎生 10.5 日目マウス胎仔とみなした。A から I のドナー細胞核を供与したマウスの日齢は A と B が P0、C と D が P1、E と F が P2、G が P3、そして H と I が P4 である。スケールバーは 1 cm を示し、A から L のすべての図に適用される。

生後 0-4 日齢のマウス大脳皮質由来の細胞集団を核染色溶液 DAPI と分化神経細胞核マーカー NeuN 抗体を用いて免疫染色したところ、核の直径約 7-9  $\mu\text{m}$  の細胞が NeuN 陽性の神経細胞であったことから本研究では細胞調整培地内で直径 6-7  $\mu\text{m}$  を示す細胞を核移植に用いた。除核未受精卵に分化神経細胞核を注入してもクローンマウスが得られなかったが、卵丘細胞核からクローンマウスが 3 匹得られた。我々は分化した神経

細胞核の多分化能にその原因があると推測し、次に神経細胞核の分化能力を判定する目的で神経細胞核クローンマウス胎仔を作製した。その結果、40匹の胎生10.5日目クローンマウス胎仔が得られ、その内38匹に形態的な異常(神経管閉鎖不全、心臓肥大、発達遅延)が認められた(図29、30)。対照群として作製した卵丘細胞核クローンマウス胎仔では、発生遅延が認められるものの神経管での異常はほとんど認められなかった。この結果を受けて、Nissl染色法を用いた神経管の組織学的解析を行った結果、神経管の不完全閉鎖や組織の異所的欠落が認められた(図31)。この形態学的異常を詳細に解析する目的で分化神経細胞マーカー $\beta$  III-tubulin抗体と増殖細胞マーカーKi-67抗体を用いて二重免疫染色を行った結果、増殖細胞、及び正常な分化神経細胞の局在が観察できなかった(図32)。このように、神経細胞核クローン胎仔の神経管は組織レベルでも異常性を示した。以上の結果から、分化神経細胞核クローン胚は神経組織を正常に形成することができないことが明らかになった。

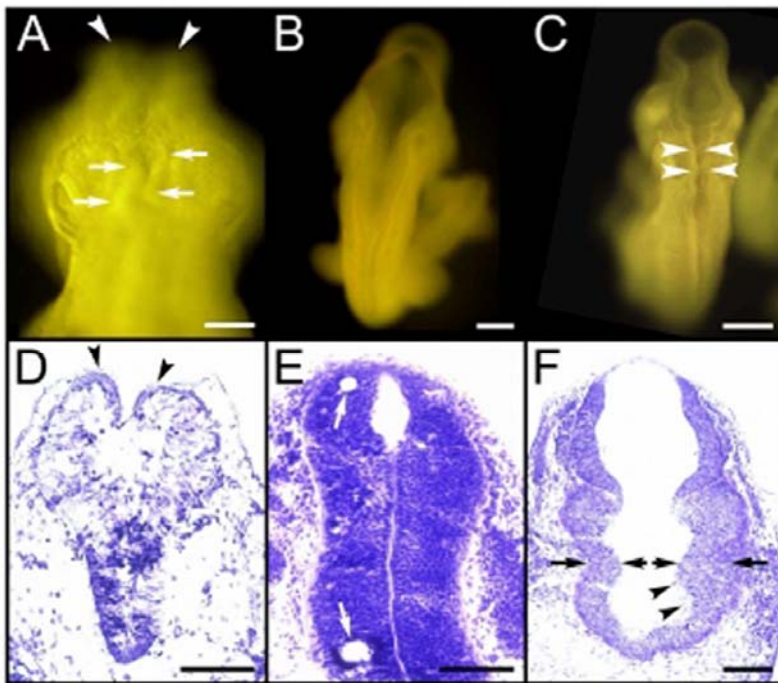


図 31 分化神経細胞核クローン胎仔の神経管における形態異常  
胎生10.5日目の分化神経細胞核クローン胎仔(A, B, C)のニッスル染色像をそれぞれD, E, Fで示している。AとDは図30B, BとEは図30D、そしてCとFは図30Hに示した胎仔と同一個体である。CとDの矢頭は神経管閉鎖不全を示している。Eの矢印は円形状の細胞の欠落部分を示している。Fの矢頭は神経管内腔側組織から遊離した細胞を示している。また、Fの個体では神経管内腔側のゆがみが顕著に認められた。スケールバーは1 mm (A)、5 mm (B, C)、100  $\mu$ m (D, E, F)を示している。

次に我々は、分化神経核由来のクローン細胞の細胞分化能力を明らかにすることを目的として、正常胚との集合キメラマウスを用いた解析を試みた。集合キメラマウスにおいて神経細胞核クローン由来の細胞を識別するために、全細胞でLacZ遺伝子が発現するマウスROSAHtをドナー細胞提供マウスに用いた。このことにより、神経細胞核クローン胚由来の細胞は $\beta$ -gal染色によって集合キメラマウス胎仔、集合キメラマウスで青色に染色されると同時に、集合キメラマウスでは細胞核提供マウスの遺伝的背景を反映してagoutiカラーの体毛として識別可能となる。集合キメラマウスは2匹得られ、神経細胞核クローン胚由来の細胞の集合キメラマウスの体毛や腎臓の近位尿細管形成細胞への分化が確認できた。また、集合キメラ胎仔において、神経細胞核クローン胚由来の細胞の三胚葉組織への分布が観察されたが、神経系組織では異常(核の脱落



や凝集)が認められたことから、集合キメラ胎仔においても分化神経細胞の核内情報の変換が維持されている可能性が推測された。以上の結果から、神経細胞核クローン胚由来の細胞は成体の神経系組織以外の細胞への分化が許されることが明らかになった。

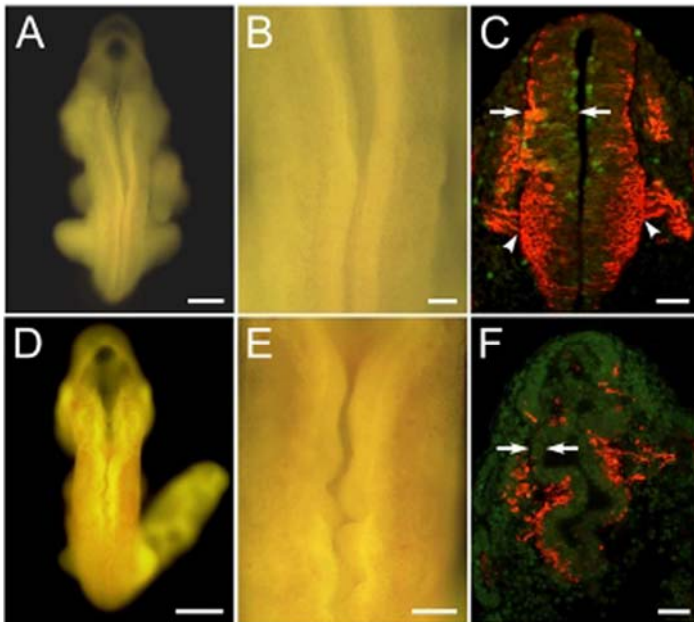


図 32 神経細胞核クローン胎仔の神経管における神経細胞マーカーの発現様式  
胎生 10.5 日目野生型 B6D2F1 の胎仔 (A) と神経細胞核クローン胎仔 (D) との神経管の拡大写真をそれぞれ B、E に蛍光免疫染色像をそれぞれ C、F に示している。A、B、C は図 30L に示した胎仔と同一個体である。野生型胎仔 (B) と比較して神経細胞核クローン胎仔 (E) の神経管閉鎖部に著しい歪みが認められた。野生型胎仔 (C) と比較して神経細胞核クローン胎仔 (F) の神経管は管を形成する細胞層の厚さが非常に薄く、また、そこでは  $\beta$  III-tubulin (分化した神経細胞マーカー; 赤色) の発現がほとんど認められず、内腔側における Ki-67 (増殖細胞マーカー; 緑色) の発現も検出できなかった。スケールバーは 5 mm (A, D)、1 mm (B, E)、50  $\mu$ m (C, E) を示している。

これまでの結果は分化神経核では神経発生過程において、再度神経細胞に分化できない不可逆的変化が遺伝情報レベルで生じている可能性を示唆するものであり、この強固な運命決定の時期や、その神経細胞発生過程、及び個体発生における意義を明らかにすることも今後の課題の 1 つであると考えられる。近年、発達過程のマウス脳における DNA 二本鎖切断やアポトーシスの観察が報告されていることから、神経細胞核において、DNA レベルの情報変換が生じている可能性を示唆した本研究は、神経細胞分化過程において遺伝情報変換が生じる可能性を強く支持する有用な結果を示したと言える。また、クローンマウスの誕生以降、ドナー細胞核の発生学的能力はクローン胚の初期化遺伝子やゲノムのメチル化状態の評価により行われている。初期発生は卵子の遺伝子発現によって制御されることを考慮すると、クローンマウス胎仔を用いて、個体発生能がドナー細胞核の遺伝情報に起因する可能性を示唆した本研究は体細胞核全般の機能解析や単一細胞レベルの分化、未分化の意義の解明する新しい解析法を提唱したと考えられる。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

神経細胞核を用いたクローン胚作製は、本研究が世界的にも先駆的なものであり、多くの結果が得られた。本研究により示された神経細胞の分化過程での核情報変換については、エピジェネティックな変換が予想される。通常の核移植によるクローンマウス胚作製では、神経管での異常が高頻度で得られる。この神経細胞の分化過程における核情報変換機構の解析は、今後、神経細胞の多様化獲得機構に関与する可能性もあり、更に解析を進めて行く必要がある。本研究では、クローンマウス作製技術が、個々の神経細胞の核情報の解析に応用可能であることを示唆したものであり、増殖しない分化した神経細胞におけるゲノム情報の解析では不可欠な技術となることが予想される。

## 3. 4 遺伝子変換マウスの作製と解析(生理研グループ)

### (1) 研究実施内容及び成果

CNR/プロトカドヘリンファミリーの機能、転写制御機構などをマウス個体レベルで解析することを目的とし、種々の遺伝子改変マウスの作製を行った。

#### 1) ノックアウトマウス・ノックダウンマウス作製

CNR/プロトカドヘリン遺伝子産物はスプライシングの際に使われる定常領域エクソン CP3 の領域の違いから A 型、B 型と称されるスプライスバリエントが存在する。これらのスプライスバリエントの機能の相違を解明する目的でこれらバリエント特異的ノックアウトマウスを作製した。

##### A) ΔA マウス

CP3 エクソン内に存在する A 型エクソンに終始コドン挿入している。

##### B) ΔB マウス

CP3 エクソン内の B 型エクソンのスプライシングアクセプター直後にストップコドン挿入してあるため B 型スプライスバリエントが欠損している。また、それに伴い A 型スプライスバリエントの発現量の低下が認められた。この結果は両スプライスバリエントがお互いの発現制御に関わっている可能性を示唆している。

##### C) CNR 遺伝子ノックアウトマウス

上記の ΔB マウス及び G1 マウス(後述)を交配し、更に組み換え酵素 Cre を発現するトランスジェニックマウス (Cre Tg)を交配させることで定常領域エクソンの全てを欠損した。このマウスにおいては CNR/プロトカドヘリン全分子種が発現していないため、CNR/プロトカドヘリン遺伝子ノックアウトマウスとして表現型の解析を進めている。

##### D) dNeo マウス

定常領域 CP3 エクソン中の polyA 付加シグナルを欠損させたマウス。このマウスにおいては CNR/プロトカドヘリンの発現量の低下が観察され、現在 CNR/プロトカドヘリン遺伝子ノックダウンマウスとして、マウス表現型の解析を行っている。

## 2) loxP 導入マウス作製

CNR/プロトカドヘリン遺伝子は染色体上にタンデムに並んだ 14 個の可変領域エクソンと 3 つのエクソンからなる共通領域からなるクラスター構造を有し、各 CNR/プロトカドヘリン分子種はそれぞれひとつの可変領域エクソンと共通領域から転写されていることが明らかになっている。この分子種の多様性は神経細胞の多様化に寄与していることが予想される。そこでこのことを証明するために可変領域エクソン数を変換した遺伝子改変マウスの作製を試みた。CNR/プロトカドヘリン遺伝子は 200 kb を越える長大な構造を持つために一般的に行われている 1 種のターゲティングベクターの導入のみでは遺伝子の欠損を行なうことが困難である。そこで我々は同遺伝子の任意の位置に loxP 配列を挿入した種々の遺伝子ターゲティングマウスを作製し、それらと更に Cre Tg を利用することで長い遺伝子領域を欠損させることを試みた。以下は本研究期間内に作製された loxP 配列導入マウスである。

- A) G16 マウス: CNR/プロトカドヘリン遺伝子可変領域 v1 エクソンと v2 エクソン間に loxP 配列を導入
- B) G1 マウス: 同可変領域 c2 エクソンと定常領域エクソン CP1 間に loxP 配列を導入
- C) CP3 マウス: 同定常領域 CP3 エクソン下流に loxP 配列を導入
- D) b22 マウス: Pcdhb 遺伝子下流に loxP 配列を導入
- E) EN130 マウス: Pcdhg 遺伝子下流に loxP 配列を導入

また、これらの以外のコンディショナルターゲティングマウスなどの他の遺伝子改変マウスも改変領域に loxP 配列が挿入されているために同様に可変領域エクソン数を変換したマウスの作製に応用ができる。現在、これらの各マウスを交配し、可変領域エクソン数を変換したマウスを作製している。

## 3) コンディショナルターゲティングマウスの作製

CNR/プロトカドヘリン遺伝子を Cre 遺伝子を発現することで発生時期あるいは組織特異的に欠損させることが可能なマウスの作製を目的とし、標的遺伝子を loxP 配列で挟むように遺伝子を導入した。

- A) C1C マウス  
定常領域エクソン CP1 の両端に loxP 配列を導入してある。
- B) CP2 マウス  
上記 C1C 同様に定常領域エクソン CP2 の両端に loxP 配列を導入してある。  
また、各ターゲティングベクターを ES 細胞に 2 回導入し、コンディショナルに遺伝子を欠損するマウスの作製も行った。
- C) G1-CP3 マウス  
まず、ターゲティングベクターを導入し可変領域 c2 エクソンと定常領域エクソン CP1 間に loxP 配列を挿入した ES 細胞を単離した後、再度ターゲティングベクターを導入することで、CP3 エクソン下流に loxP 配列を導入した。このマウスは定常領域エクソンの両端に loxP 配列を有しているため Cre の発現により全 CNR/プロトカドヘリン遺伝子が欠損するコンディショナルノックアウトマウスとして用いることができる。

#### D) G16-G1 マウス

G1-CP3 マウスと同様の方法で可変領域 v1 エクソンと v2 エクソン間、及び c2 エクソンと定常領域エクソン CP1 間に loxP 配列を挿入した。このマウスは Cre の発現により CNR/プロトカドヘリン v1 のみが発現することが期待できる。

#### 4) 発現制御解析に用いる遺伝子改変マウスの作製

単一神経細胞における CNR/プロトカドヘリン各分子種の発現様式を RT-PCR を用いて染色体レベルで解析した結果、一つの神経細胞では CNR は複数の分子種を発現しており、その組み合わせは個々の神経細胞ごとに異なっていた。また、各分子種について染色体由来を調べると、片方の染色体のみに由来するものが多数であった。これらは中枢神経系における新たな染色体遺伝子発現機構であり、神経細胞の多様性に寄与していると考えられる。そこでこの特異な転写制御機構を明らかにするために以下に示す各遺伝子変換マウスについても作製を行った。

##### A) 蛍光タンパク質ノックインマウス

各可変領域エクソンに蛍光タンパク質遺伝子を導入し、その CNR/プロトカドヘリン分子種が発現している細胞では蛍光が観察できる事を期待して種々のノックインマウスを作製している。現時点で CNR/プロトカドヘリン v11 エクソンに赤色蛍光タンパク質 HcRed 遺伝子をノックインしたマウスが得られている。このマウスでは HcRed 遺伝子が発現していることが確認された。また転写制御領域と予想される遺伝子を変換したマウスの作製についても現在進行している。

##### B) TKO マウス

ヒト及びマウスのゲノム配列を比較したところ、CNR/プロトカドヘリン遺伝子の上流に約 5 kbp にわたる領域が高度に保存されていることが明らかになった。この領域は CNR/プロトカドヘリン遺伝子の発現制御に関わっていることが予想されるために、この領域を欠損したマウスを作製している。またこの欠損した領域には loxP 配列が挿入されているため、既に完成している上記遺伝子改変マウスと交配し更に Cre 遺伝子トランスジェニックマウスと交配することでさらなる遺伝子欠損マウスの作製が可能となる。具体的には、CP3 マウスと交配させることで CNR/プロトカドヘリン遺伝子全領域が、b22 マウスと交配させると CNR/プロトカドヘリンとプロトカドヘリン $\beta$  の両遺伝子が、更には EN130 マウスと交配させるとプロトカドヘリンファミリー全遺伝子を欠損させたマウスの作製することができる。

##### C) SR マウス

CNR/プロトカドヘリン定常領域エクソン CP1 の上流にヒト、チンパンジー、ウシ、ラット、マウスなどのあらゆる哺乳動物において約 200 bp の配列が保存されており、この配列は可変領域エクソンと定常領域エクソンの間に位置すること、これまでに報告されている各転写因子の結合モチーフを有することなどから CNR/プロトカドヘリン遺伝子のスプライシングを制御し、細胞内で発現する CNR/プロトカドヘリンの分子種の決定に関わっている可能性が考えられる。現在この領域をコンディショナルに欠損する遺伝子改変マウスを作製している。

これらのマウスを用いて CNR/プロトカドヘリン遺伝子の発現様式を解析することで、CNR 遺伝子の発現制御機構のみならず新たな制御機構の発見につながることを期待できる。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

これまでに作製が終了した各 CNR/プロトカドヘリン遺伝子改変マウスについては解剖学的解析、行動解析など表現型について解析が進められている。また、CNR/プロトカドヘリン遺伝子ノックアウトマウスについては同遺伝子産物と相互作用するタンパク質の検索などの情報伝達系解析の実験材料としても有用であり、これらの遺伝子欠損、変換マウスを用いた CNR/プロトカドヘリンタンパク質相互作用分子群の解析、同定を行なうことができる。

これら遺伝子改変マウスから得られる知見はプロトカドヘリンファミリー遺伝子の機能が明らかになることにとどまらず、脳神経系における神経細胞の多様化機構などについても新たな発見があることが予想される。また近年、CNR/プロトカドヘリン遺伝子とヒト精神神経疾患との関連性が示唆されてきている。これら CNR/プロトカドヘリンマウスは、これらヒト疾患でのモデルマウスになることが予想され、疾患発症機構や治療法の解明に役立つことが期待できる。

### 3. 5 遺伝子改変マウス作製によるクラスター型カドヘリンの分子機能の解析 (福岡女子大学グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

本グループは平成 17 年度に大阪大学・八木グループから福岡女子大学に異動したメンバーにより構成され、独立したグループとなってからは半年程度であり、現在は主に研究室等の整備を進めている。本研究が開始された時点(2000 年)においてクラスター型カドヘリンの機能は、まったく不明であった。クラスター型カドヘリンは、1) 中枢神経系に強く発現し、2) 少なくとも一部のタンパク質が軸索やシナプスに存在すること、3) 神経回路・シナプス形成期において強い発現を示すことから、神経回路形成あるいはシナプス形成における何らかの機能を担っているのではないかと予想された。更にクラスター型カドヘリンは多様性ととともに、カドヘリンドメインを介したホモフィリックな接着特異性が予想されることから、多種多様な神経細胞が適切な神経細胞を選びシナプスを形成する過程、「選択的シナプス形成過程」に関与するのではないかと仮説が提唱されていた。本グループは、この仮説の検証を試みるため、CNR 遺伝子改変マウスの作成を行ってきた。また、表現型解析の対象となる神経回路を選択するため、CNR の発現解析も同時に進めてきた。その結果、これまでに 3 種類、4 系統の CNR 遺伝子改変マウスを樹立し、そのうち 2 種類の CNR 遺伝子改変マウスにおいて、CNR が強く発現する神経系において、神経回路形成異常、行動異常の興味深い表現型が認められた。現在、論文投稿中である。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

クラスター型カドヘリンが報告された当初、これらの分子群は、適切な神経細胞間でシナプス結合を形成するために必要な分子であり、スペリーの唱えた化学親和説の分子の実体ではないかと推測された。しかしこの仮説は今までのところ十分検証されてはいない。CNR 以外のクラスター型カドヘリンでは、プロトカドヘリンファミリー欠損マウスが最近(2002年)報告され、脊髄における神経細胞死、シナプス数の減少など興味深い表現型の報告がなされているが、神経細胞の標的選択性を担う分子の実体なのではないかという仮説については未だに十分検証されないまま今日に至っている。私たちが作成した CNR 遺伝子改変マウス(CNR<sup>ΔCP/ΔCP</sup>マウス)は、嗅神経系において、標的近傍までの軸索ガイダンスはほぼ正常であるが、最終的に標的糸球体を選ぶ過程での異常が生じていると考えられ、神経細胞の標的選択性にクラスター型カドヘリンが何らかの形で関与していることを示唆する。今後は作成した CNR 遺伝子改変マウスを用いることにより、標的選択性に異常を生じる機構を明らかにできると期待され、クラスター型カドヘリンの機能解明に大きな役割を果たすと思われる。

## 3. 6 クローンマウス作製による神経細胞核情報変換機構の解析 (三菱化学生命科学研究所グループ)

### (1) 研究実施内容及び成果

本研究グループは、平成 14 年度から平成 16 年度まで大阪大学グループ内で神経細胞核情報変換の可能性を検証するために神経細胞核由来のクローンマウスの作成に従事してきた。その間、神経細胞核由来クローン胚から ES 細胞を樹立し、*in vivo*, *in vitro* の分化能力を解析した。

本研究グループの発足までに、本 CREST 研究において、

- 1) マウス大脳皮質神経系細胞において、分化系譜の進展に伴う可塑的分化能力の制限が増強される(分化した神経細胞ほど、クローン個体が得られにくい)。
- 2) 分化神経細胞が主要な細胞構成となっている出生直後のマウス大脳皮質由来の神経細胞から得られたクローンマウスは胚発生異常が頻発し、特に神経管形成不全が観察される。
- 3) 生後 2-3 週齢マウス大脳皮質神経細胞核由来のクローン個体は、神経細胞核由来の ES 細胞を樹立することにより作成可能である。  
が明らかとなった。

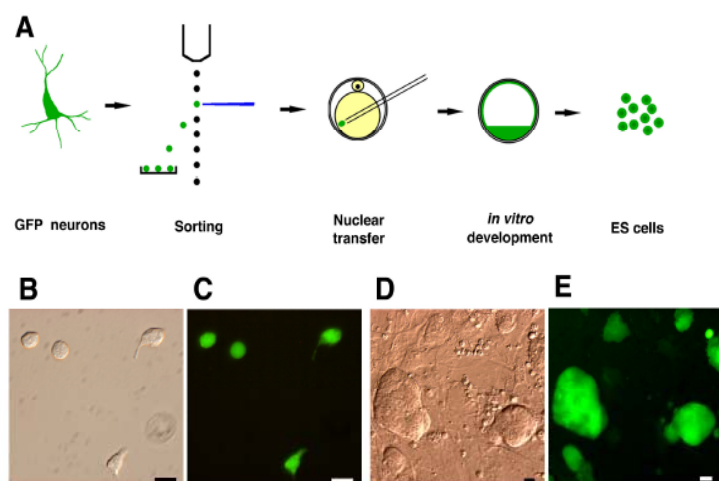


図 33 GFP 発現神経細胞核由来のクローン胚の作成。  
 A. 実験の流れ。図 1 で得られたマウス大脳皮質から細胞を分離し、セルソーターにより GFP 陽性細胞を濃縮した(B, C)。得られた細胞分画を用いて核移植を行い、試験管内培養の後、胚盤胞を得て、それから胚性幹 (ES) 細胞株を樹立した(D, E)。(B、D)明視野。(C、E)暗視野。

本研究グループは、3)の研究を平成 14 年度から 16 年度まで八木グループ内で主体的に行ってきた。組み換え酵素 Cre を CAMKII  $\alpha$  遺伝子プロモーター、または Nex-1 (Neuronal bHLH タイプ転写因子) 遺伝子制御下で発現するマウスと、loxP 配列で挟まれた DNA が Cre により欠失し、その結果 GFP 遺伝子が全身性 CAG プロモーターにより発現するマウスを交配した。その結果、神経細胞特異的に蛍光蛋白(GFP)が発現した。同様に GFP 遺伝子が GAD67 遺伝子内に挿入されたマウスも準備した。Cre を発現するマウスは C57BL/6 マウス系統であり、EGFP を発現するマウスは DBA/2 系統に 2-3 代戻し交配したものを用いた。C57BL/6 系統と DBA/2 系統との雑種第 1 代が核移植に最適な系統である事がこれまでの研究により解っていたからである。

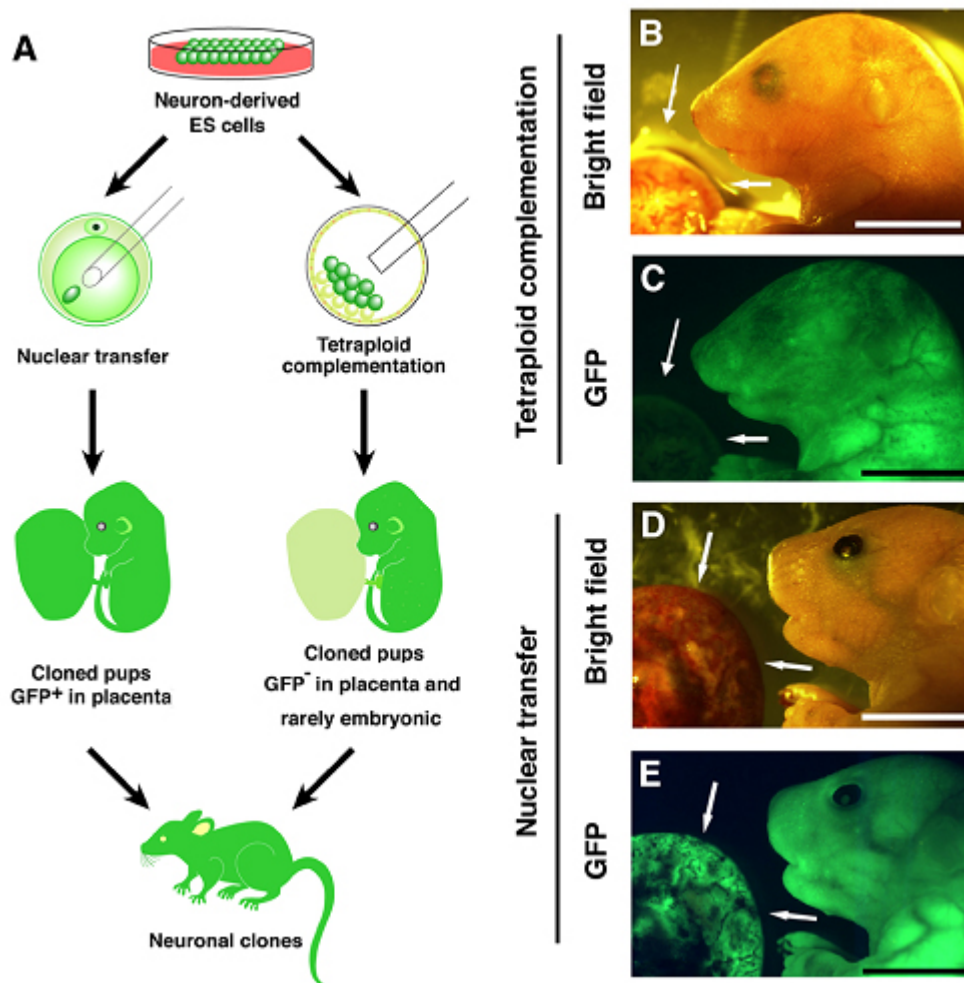


図 34 ES 細胞由来の個体作成。A. 実験の流れ。神経細胞核由来の ES 細胞を野生型 4 倍体胚に注入して発生させた場合(右)。得られた胚は GFP 陽性だが、胎盤は陰性(B, C)。神経細胞核由来の ES 細胞をドナーとして核移植した場合(左)。得られた胚、胎盤は共に GFP 陽性となる(D, E)。(B, D)明視野。(C, E)暗視野。

これら 3 種のマウスからそれぞれ GFP 陽性細胞をセルソーターにより分取し、除核卵子に注入した。2026 個の GFP 陽性細胞を注入したところ、1067 個が移植後生存し、その内 635 個が発生を開始した。結果的に 76 個の胚が着床前までの段階(胚盤胞期)まで到達した。それらを試験管内で培養し胚性幹(ES)細胞を樹立したところ、6 lines の ES 細胞株が樹立できた(図 33)。実験系が異なるため単純な比較は難しいが、本実験における EGFP 陽性神経細胞核由来のクローン胚の胚発生率は他の体細胞種と比較して低かった。

得られた ES 細胞由来の個体を得るために、1)野生型 4 倍体胚とのキメラマウスの作成。2)神経細胞核由来 ES 細胞をドナーとする核移植。の 2 つの方法で行った(図 34)。1)に関しては、992 個の 4 倍体胚盤胞に、神経細胞核由来 ES 細胞を注入したところ、3 lines から計 19 匹の産子を得られた。4 倍体胚は、2 細胞期の野生型(B6D2F1 マウス系統)胚を電気融合させたものを発生させたものを用いた。2)に関しては、2179 個の ES 細



胞核を除核卵子に移植し、1301 個が生存し 902 個が発生を開始した。その結果、3 lines から計 4 匹の産子が得られた。これらの実験結果から、神経細胞核は、それ由来の ES 細胞を樹立することにより、分化能力を賦活化しうることを示された。

生存したクローンマウスの脳組織を調べたところ、大脳構築に大きな異常は認められず、免疫組織化学的解析からも神経細胞系譜は概ね正常に発生していることが示された。これらの成果は、Journal of Neuroscience 誌に受理され、同誌の “The journal of this week.” に取り上げられた。そこでの Editor からのコメントとして、クローン個体の作成に至るまでに大部分の神経細胞核由来のクローン胚は発生を停止していることから、神経細胞核の分化能力については “全能性” という点からは制限が生じているのでは、というものであった。従って、神経細胞のリプログラミングを制限するメカニズムを知ることは、体細胞クローン個体の胚発生で生じる epi-mutation の発生メカニズムを知るだけでなく、神経細胞核特異性を産むエピジェネティクスを理解することにつながると考えられる。

以上の観点から平成 17 年度より本研究グループは、特に、2)、3)の成果に注目し、単一神経細胞核のゲノムのリプログラミングを阻害する分子メカニズムの解明を研究目標において研究を開始している。2)の結果は、大脳皮質神経系細胞核のリプログラミングについての概ねの傾向について重要な知見を提示した。得られた結果が神経細胞特異的であるかは、さらなる詳細な解析が必要であり、本研究グループが継承すべきテーマだと考えた。本研究グループは、3)において分化神経細胞核を高率に蛍光標識(GFP 発現)する方法を保持しているからである。また 3)では、少なくとも神経細胞核は可塑的分化能力を保持することは示されたが、その頻度は著しく低い状態であることも示唆された。従って 2)、3)共に神経細胞核の多様性を反映した結果だとも推測される。従って、本研究グループは、発生工学的手法を用いて分化神経細胞を特異的に GFP 標識させた神経細胞核を用いた神経細胞核クローン胚の神経発生時の異常性を解析している。現在進行形でありまだ確定的な成果は得られていない。

1)について、神経細胞の分化過程の前後においてクローン胚作成の効率が著しく低いことから DNA 再構成の可能性が強くと示唆された。しかしながら、2)の結果において、分化神経細胞核の可塑的分化能力は神経発生に強い制限を受けるが個体間の差があることが示され、そのばらつきの程度は、DNA 再構成による不可逆的な制限に起因する可能性は必ずしも高くない、という印象を与えた。この間、DNA 再構成を受けた免疫細胞核由来のクローン個体の作成が報告され(Hochedlinger and Jaenisch, Nature, 2002)、ゲノム一次構造の変化が必ずしも個体発生の不可逆的な制限の必要十分条件ではないことが示された。更に、3)の報告において、ES 細胞の樹立によって大脳皮質神経細胞核の可塑的分化能力が増進することが示されたのは神経細胞核のエピジェネティックなゲノムの変化が、可塑的分化能力を制限している原因が高いことを示唆している。体細胞クローン技術の成功効率が依然として低いこともあり慎重な解析が必要であるが、個々の神経核クローン胚を、遺伝子レベル、細胞レベル、組織レベルと階層的に解析することで、神経細胞核クローンの epi-mutation の原因、については神経細胞核ゲノムの変化の核心を得たい。

近年、トランスポジションによる神経細胞核のゲノムの一次構造変化が示唆された

(Muotri et al., Nature, 2005)。全ての神経細胞核ゲノムに生じる現象なのかは今後の解析が待たれる点ではあるが、神経細胞核クローン胚ゲノムにおいてトランスポジションの形跡が検出できるか、あるのであれば神経発生・機能関連遺伝子あるいはその調節ゲノム領域にあるかという点なども興味深い研究課題として残されている。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

体細胞核クローンの解析は、epi-mutation の発生機序の解明に他ならない。ゲノム一次構造が相同な体細胞核由来のクローン個体及び胚は発生異常だけでなく、生まれた成体においても異常を示すからである。その epi-mutation の機序は発癌メカニズムにも共通すると考えられる。神経細胞核クローンにおいては、神経細胞を体細胞の一つと考えれば、そのクローン胚の解析は上記の epi-mutation の発生機序の解明に重要な知見を提示する事が期待される。神経細胞特異的な epi-mutation が明らかになれば、それは神経発生・分化及び神経機能を支える核内エピジェネティックスに大きなインパクトを与える。これと平行してクローン胚のゲノム解析を通じて、トランスポジションなどのゲノム一次構造変化についての検証も可能となり、新たな神経細胞核の多様性を生み出すメカニズムを提示しうる。

## 4. 研究参加者

### ①大阪大学グループ(代表者：八木 健)

(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)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
八木 健	大阪大学大学院 生命機能研究科	教授	研究全般	H12.11~H18.3
平林 敬浩	生理学研究所	助手	遺伝子変換細胞、マウス作製	H14.9~H17.3
	大阪大学大学院 生命機能研究科			H17.4~H18.3
平山 晃斉	大阪大学大学院 生命機能研究科	研究員	クラスター型カドヘリンの ゲノム構造解析	H13.4~H18.3
森下 博文	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	クラスター型 カドヘリンの機能解析	H13.4~H17.3
		研究員		H17.4~H18.3
金子 涼輔	生理学研究所	研究員	遺伝子変換細胞、マウス作製	H13.12~H17.3
	大阪大学大学院 生命機能研究科			H17.4~H18.3
長谷川園子	大阪大学大学院 理学研究科	大学院生	クラスター型 カドヘリンの機能解析	H13.4~H18.3
川口 将史	大阪大学大学院 医学系研究科	大学院生	クラスター型 カドヘリンの機能解析	H15.4~H18.3
雲出 佑	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	クラスター型 カドヘリンの機能解析	H14.4~H18.3

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
内村 有邦	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	クラスター型 カドヘリンの多型解析	H16.4～H18.3
河村 佳見	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	神経細胞ゲノム 構造変化の解析	H14.4～H18.3
福田 絵美	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	クラスター型 カドヘリンの機能解析	H15.4～H18.3
伊早坂 智子	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	クラスター型 カドヘリンの多型解析	H15.4～H17.3
加藤 宏幸	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	神経細胞ゲノム 構造変化の解析	H16.4～H18.3
香取 将太	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	クラスター型 カドヘリンの機能解析	H16.4～H18.3
日高 裕子	大阪大学大学院 生命機能研究科	研究生	クラスター型 カドヘリンの多型解析	H16.4～H17.3
		技術補佐員		H17.4～H18.3
入江 かおる	大阪大学大学院 生命機能研究科	CREST 技術員	クラスター型 カドヘリンの機能解析	H13.4～H14.3
奥田 糧子	大阪大学大学院 生命機能研究科	CREST 技術員	クラスター型 カドヘリンの機能解析	H13.4～H14.2
武藤 哲司	総合研究 大学院大学	大学院生	クラスター型カドヘリンの ゲノム進化の解析	H13.4～H14.3
田井 佑実	大阪大学大学院 理学研究科	大学院生	DNA修復酵素の 脳神経系での役割	H13.4～H15.3
三木 理恵	大阪大学大学院 理学研究科	大学院生	クラスター型 カドヘリンの多型解析	H13.4～H15.3
宮崎 充弘	大阪大学大学院 理学研究科	大学院生	クラスター型カドヘリンの ゲノム構造解析	H13.4～H15.3
村田 陽二	大阪大学大学院 生命機能研究科	CREST 研究員	クラスター型 カドヘリンの機能解析	H13.4～H16.3
村井 真知子	大阪大学大学院 理学研究科	大学院生	DNA修復酵素の 脳神経系での役割	H14.4～H16.3
高山 貴至	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	脳機能制御に関わる 増減分子解析	H14.4～H16.3
小竹 康代	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	クラスター型 カドヘリンの機能解析	H14.4～H16.3
杉野 英彦	大阪大学大学院 生命機能研究科	助手	クラスター型カドヘリンの ゲノム構造解析	H12.11～H17.3
服部 功太郎	大阪大学大学院 生命機能研究科	CREST 研究員	クラスター型 カドヘリンの多型解析	H13.4～H16.3
牧野 初音	総合研究大学院大学	大学院生	クローンマウス 作製と解析	H13.4～H16.3
	大阪大学大学院 生命機能研究科	研究員		H16.4～H16.8
江角 重行	大阪大学大学院 理学研究科	大学院生	単一細胞ゲノム 構造解析	H14.4～H17.3
田口 祐介	大阪大学大学院 理学研究科	大学院生	BACライブラリーの 作製と解析	H13.4～H17.3

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
工藤 静香	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	神経細胞ゲノム 構造変化の解析	H15.4～H17.3
佐々木 綾子	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	クラスター型カドヘリンの ゲノム構造解析	H15.4～H17.3
海津 正賢	大阪大学大学院 医学系研究科	大学院生	クラスター型 カドヘリンの機能解析	H16.4～H17.3
山口 幸子	大阪大学大学院 医学系研究科	大学院生	クラスター型 カドヘリンの機能解析	H15.4～H17.3
野口 由紀子	大阪大学大学院 医学系研究科	大学院生	遺伝子変換細胞、マウス作製	H15.4～H17.3
多田 基紀	総合研究大学院大学	大学院生	クラスター型カドヘリンの ゲノム進化の解析	H13.4～H16.3
	大阪大学大学院 生命機能研究科	研究員		H16.4～H17.3

## ②慶應義塾大学グループ(代表者：浅川修一)

(ゲノムライブラリー作製によるゲノム構造の解析)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
浅川 修一	慶應義塾大学 医学部	助手	BAC ライブラリーグループの統括	H13.4～H18.3
石井 靖幸	慶應義塾大学 医学部	CREST 技術員	BAC ライブラリーの作製と解析	H13.4～H17.3

## 生理研グループ(代表者：平林真澄)

(神経細胞核を用いたクローン動物作製)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
平林 真澄	生理学研究所	助教授	クローンラット作製系の開発	H14.4～H18.3
三寶 誠	生理学研究所	技術員	遺伝子変換細胞、マウス作製	H13.12～H18.3
加藤めぐみ	生理学研究所	CREST 技術員	クローンラット作製系の開発	H14.4～H16.3
		技術員		H16.4～H18.3
山内奈央子	生理学研究所	CREST 技術員	遺伝子変換細胞、マウス作製	H13.12～H17.11
三寶 千秋	生理学研究所	技術員	遺伝子変換細胞、マウス作製	H14.4～H16.11
先崎 浩次	生理学研究所	助手	遺伝子変換細胞、マウス作製	H13.12～H14.8
	国立精神・神経センタ ー	研究員		H15.4～H17.3
田仲 祐介	生理学研究所	研究員	遺伝子変換細胞、マウス作製	H13.12～H17.3

### 福岡女子大学グループ(代表者：濱田 俊)

(遺伝子変換マウス作製によるクラスター型カドヘリンの分子機能の解析)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
濱田 俊	大阪大学大学院 生命機能研究科	助教授	クラスター型 カドヘリンの機能解析	H12.11~H17.3
	福岡女子大学 人間環境学部			H17.4~H18.3

### 三菱生命研グループ(代表者：長田智治)

(クローンマウス作製による神経細胞核情報変換機構の解析)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
長田 智治	大阪大学大学院 生命機能研究科	CREST 研究員	神経細胞ゲノム 構造変化の解析	H14.4~H17.3
	三菱化学 生命科学研究所	研究員		H17.4~H18.3

## 5. 成果発表等

(1) 論文発表 (国内 6件、海外 59件)

### ①海外

1. Zhen-tong M, Xiao-feng M, Yagi T & Yamagishi S.: Impairment of conditioned avoidance response in Fyn-kinase deficient mice. *Chin. J. Neurosci.*, 16; 293-298 (2000)
2. Sugino H, Hamada S, Yasuda R, Tuji A, Matsuda Y, Fujita M & Yagi T.: Genomic organization of the family of CNR cadherin genes in mice and humans. *Genomics* 63; 75-87 (2000)
3. Yamazaki Y, Yagi T, Ozaki T & Imoto K.: In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker. *J. of Experimental Zoology* 286; 212-218 (2000)
4. Kitazawa H, Katoh A, Yagi T & Nagao S.: Dynamic characteristics and adaptability of reflex eye movements of Fyn kinase-deficient mice. *Neurosci. Lett.*; 280(3); 179-182 (2000)
5. Seiwa C, Sugiyama I, Yagi T, Iguchi T, & Asou H.: Fyn tyrosine kinase participates in the compact myelin sheath formation in the central nervous system. *Neurosci. Res.* 37; 21-31 (2000)
6. Yagi T & Takeichi M.: Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes & Development* 14; 1169-1180 (2000)
7. Shima Y, Yagi T, Isojima Y, Okumura N, Okada M & Nagai N.: Changes in circadian period and morphology of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus in fyn kinase-deficient mice. *Brain Res.* 870; 36-43 (2000)
8. Ito T, Kagoshima M, Sasaki Y, Li C, Udaka N, Kitukawa T, Fujisawa H, Taniguchi M, Yagi T, Kitamura H & Goshima Y.: Repulsive axon guidance molecule Sema3A inhibits branching morphogenesis of fetal mouse lung. *Mechanisms of Development* 97(1-2); 35-45 (2000)

9. Huang G-Z, Ujihara H, Takahashi S, Kaba H., Yagi T, & Inoue S.: Involvement of complexin II in synaptic plasticity in the CA1 region of the hippocampus: the use of complexin II-lacking mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 84; 179-187 (2000)
10. Kawase E, Yamazaki Y, Yagi T, Yanagimachi R, & Pedersen R.A.: Mouse embryonic stem (ES) cell lines established from neuronal cell-derived cloned blastocysts. *Genesis* 28; 156-163 (2000)
11. Nakamura K, Manabe T, Watanabe M Mamiya T, Ichikawa R, Kiyama Y, Sanbo M, Yagi T, Inoue Y, Nabeshima T, Mori H & Mishina M.: Enhancement of hippocampal LTP, reference memory and sensorimotor gating in mutant mice lacking a telencephalon-specific cell adhesion molecule. *Eur. J. Neurosci* 13; 179-189 (2001)
12. Nakahara J, Tan-Takeuchi K, Seiwa C, Yagi T, Aiso S, Kawamura K & Asou H.: Myelin basic protein is necessary for the regulation of myelin-associated glycoprotein expression in mouse oligodendroglia. *Neurosci. Lett.* 298; 163-166 (2001)
13. Hirayama T, Sugino H & Yagi T.: Somatic mutations of synaptic cadherin (CNR family) transcripts in the nervous system. *Genes to Cells* 6; 151-164 (2001)
14. Takei Y, Hamada S, Senzaki K, Mutoh T, Sugino H & Yagi T.: Two novel CNRs from the CNR gene cluster have molecular features distinct from those of CNR1 to 8. *Genomics* 72; 321-330 (2001)
15. Miyakawa T, Yagi T, Takao K & Niki H.: Differential effect of Fyn tyrosine kinase deletion on offensive and defensive aggression. *Behavioral. Brain Res.* 122; 51-56 (2001)
16. Sugimoto Y, Taniguchi M, Yagi T, Akagi Y, Nojyo Y & Tamamaki N.: Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve. *Development* 128; 3321-3330 (2001)
17. 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; 14022-14026 (2001)
18. Hamada S & Yagi T.: The cadherin-related neuronal receptor (CNR) family: a novel diversified cadherin family at the synapse. *Neurosci. Res.* 41; 207-215 (2001)
19. 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)
20. 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)
21. 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 Series* 1246:127-136 (2002)
22. 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)
23. 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)
24. Yagi T.: Diversity of the cadherin-related neuronal receptor/protocadherin family and possible DNA rearrangement in the brain. *Genes to Cells* 8; 1-8 (2003)
25. 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. *J. Neurosci.* 3 (4)1390-1307 (2003)

26. 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. *Dev Biol.* 254(2) ; 289-302 (2003)
27. 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)
28. 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)
29. Hamaguchi-Hamada K, Sanbo C, Hamada S, Yagi T.: Exposure to hexanal odor influences maternal behavior and induces neonatal death in Fyn tyrosine kinase-deficient mice. *Neurosci. Res.* 48 ; 259-267 (2003)
30. 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)
31. Yanase H, Sugino H, & Yagi T.: Genomic sequence and organization of the family of CNR /Pcdh $\alpha$  genes in Rat. *Genomics* 83(4) ; 717-726 (2004)
32. 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)
33. Yuasa S, Hattori K, & Yagi T.: Defective neocortical development in Fyn-tyrosine-kinase-deficient mice. *Neuro Report* 15(5) ; 819-822 (2004)
34. 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)
35. Kato M, Ishikawa A, Hochi S & 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)
36. Kato M, Ishikawa A, Hochi S, & 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)
37. Sugino H, Yanase H, Hamada S, Kurokawa K, Asakawa S, Shimizu N & Yagi T.: Distinct genomic sequence of the CNR/Pcdh $\alpha$  genes in chicken. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316:437-445 (2004)
38. Sugino H, Toyama T, Taguchi Y, Esumi S, Miyazaki M & Yagi T.: Negative and positive effects of an IAP-LTR on nearby Pcdh $\alpha$  gene expression in the central nervous system and neuroblastoma cell lines. *Gene* ; 4(337)91-103 (2004)
39. Abe M, Fukuya M, Yagi T, Mishina M, Watanabe M & Sakimura K.: NMDA Receptor GluR  $\epsilon$  /NR2 Subunits Are Essential for Postsynaptic Localization and Protein Stability of GluR  $\zeta$  1/NR1 Subunit. *J. Neurosci.* 24(33) ; 7292-7304 (2004)
40. Murata Y, Hamada S, Morishita H, Mutoh T & Yagi T.: Interaction with Protocadherin- $\gamma$  regulates the cell-surface expression of Protocadherin- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 279(47) ; 49508-49516 (2004)
41. 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)
42. 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)
43. 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)

44. 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)
45. Morishita H, Murata Y, Esumi S, Hamada S & Yagi T.: CNR/Pcdh $\alpha$  family in subplate neurons, and developing cortical connectivity. *Neuroreport* ;15(17):2595-2599 (2004)
46. Morishita H, Kawaguchi M, Murata Y, Seiwa C, Hamada S, Asou H & Yagi T.: Myelination triggers local loss of axonal CNR/Protocadherin $\alpha$  family protein expression. *Eur. J. Neurosci.* 20 ; 2843-2847 (2004)
47. 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) ; 323-334. (2005)
48. 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- $\alpha$  gene cluster in single neurons. *Nature Genet.* 37(2) ; 171-176 (2005)
49. 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)
50. 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.* 70(4) ; 422-8. (2005)
51. Makino H, Yamazaki Y, Hirabayashi T, Kaneko R, Hamada S, Osada T, Kawamura Y, Nanagimachi R & Yagi T.: Mouse Embryos and Chimera Cloned from Neural Cells in the Postnatal Cerebral Cortex. *Cloning and Stem Cells* 7(1) ; 7(1)45-61 (2005)
52. Miki R, Hattori K, Taguchi Y, Tada M, Isosaka T, Hidaka Y, Hirabayashi T, Hashimoto R, Fukuzako H & Yagi T.: Identification and characterization of coding single-nucleotide polymorphisms within human protocadherin- $\alpha$  and - $\beta$  gene clusters. *Gene* 11;349:1-14. (2005)
53. Taguchi Y, Koide T, Shiroishi T, Yagi T.: Molecular Evolution of Cadherin-Related Neuronal Receptor/Protocadherin $\alpha$  (CNR/Pcdh $\alpha$ ) Gene Cluster in Mus musculus Subspecies. *Mol. Biol. Evol.* 22(6):1433-1443 (2005)
54. Sudo F, Ito K, Uemura M, Shimizu M, Shinkawa Y, Sanbo M, Shinoda T, Tsuboi M, Takashima S, Yagi T & Fujisawa H.: Plexin-A4 Mediates Axon-Repulsive Activities of Both Secreted and Transmembrane Semphorins and Play Roles in Nerve Fiber Guidance. *J Neurosci.* 25(14):3628-3637 (2005)
55. Nishida K, Yamasaki S, Ito Y, Kabu K, Hattori K, Tezuka T, Nishizumi H, Kitamura D, Goitsuka R, Geha RS, Yamamoto T, Yagi T, Hirano T.: Fc{varepsilon}RI-mediated mast cell degranulation requires calcium-independent microtubule-dependent translocation of granules to the plasma membrane. *J Cell Biol.* 170(1):115-126. (2005)
56. Terawaki K, Yokomizo T, Nagase T, Toda A, Taniguchi M, Hashizume K, Yagi T & Shimizu T.: Absence of leukotriene B4 receptor 1 confers resistance to airway hyperresponsiveness and Th2 type immune responses. *J. Immunol.* 175(7):4217-4225(2005)
57. Abe T, Matsumura S, Katano T, Mabuchi T, Takagi K, Li Xu, Yamamoto A, Hattori K, Yagi T, Watanabe M, Nakazawa T, Yamamoto T, Mishina M, Nakai Y & Ito S.: Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain. *Eur J Neurosci.* 22(6):1445-1454(2005)
58. Osada T, Tamamaki N, Song S-Y, Kakazu N, Yamazaki Y, Makino H, Sasaki A, Hirayama T, Hamada S, Nave K-A, Yanagimachi R & Yagi T.: Developmental pluripotency of the nuclei



- of neurons in the cerebral cortex of juvenile mice. *J. Neurosci.* 25(37); 8368-8374 (2005)
59. Hirayama T, Sasaki A & Yagi T.: Evaluation of somatic alterations of Pcdh- $\alpha$  transcripts in the brain by cDNA analysis without PCR. *Genes to Cells* in press

②国内

1. 先崎浩次、八木 健 : CNR 遺伝子の発見からみた脳, 遺伝子医学, 4(2). 76-85(2000)
2. 先崎浩次、小川正晴、八木 健 : マウス大脳皮質層構造形成機構における新たな分子メカニズムの解明 -CNR ファミリーは Reelin の多重受容体である, 実験医学, 18(6). 784-787(2000)
3. 濱田 俊、八木健 : シナプス形成とカドヘリンスーパーファミリー, - 選択的シナプス結合形成の分子基盤か?, 脳 21, 3(4) 419-426 (2001)
4. 八木健編 : ジーンターゲットングの最新技術、羊土社、2000
5. 杉野英彦 : シナプスにおける接着分子の機能, 脳の科学, 23. 317-326 (2001)
6. 服部功太郎、八木健 : Reelin と統合失調症, Schizophrenia Frontier vol.5 No.3

(2) 口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

平成 12 年度

①招待、口頭講演 (国内 1 件、海外 2 件)

1. Yagi T. (大阪大学): Synaptic signaling pathways of Fyn-tyrosine kinase., The 10th Congress of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism, Yokohama, Japan (2000)
2. Yagi T. (大阪大学): Signalling cascade of CNR cadherins (reelin receptors) in the mammalian brain., SEB ANNUAL SYMPOSIUM, Cambridge, UK (2000)
3. Yagi T. (大阪大学): CNR family in the central nervous system., The American Society for Cell Biology 40th Annual Meeting, San Francisco, USA, (2000)

②ポスター発表 (国内 10 件、海外 0 件)

1. Senzaki K(生理学研究所), Ogawa M and Yagi T.: Proteins of the CNR family are multiple receptor for Reelin., The 43rd NIBB Conference "Mechanisms of Neural Network Formation" Okazaki, Japan(2000)
2. Senzaki K(生理学研究所), Ogawa M and Yagi T.: Proteins of the CNR family are multiple receptor for Reelin.,The 44th NIBB Conference "Evolution and Development: Generality and Diversity of Development in Animals and Plants", Okazaki, Japan(2000)
3. 先崎浩次(生理学研究所)、小川正晴、八木健 : 大脳皮質形成過程における新たな分子メカニズムの解明, 第 73 回 日本生化学会大会シンポジウム, 横浜(2000)
4. 八木 健(大阪大学) : Fyn 結合型新規カドヘリン(CNR)の解析, 第 73 回 日本生化学会大会シンポジウム, 2000, 横浜
5. 八木 健(大阪大学) : 大脳皮質層構造形成における分子メカニズムの解析, 第 23 回日本神経科学会大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会シンポジウム, 横浜(2000)
6. 八木 健(大阪大学) : 神経系シナプスでの新規カドヘリン CNR family の解析, 第 14 回鹿児島ブレインサイエンスカンファランス, 鹿児島(2000)
7. 八木 健(大阪大学) : 神経系シナプスでの新規カドヘリン CNR family の解析, 第 5 回遺伝子医療研究会シンポジウム, 神戸(2001)
8. 八木 健(大阪大学) : 脳の階層構造と CNR/Fyn コンプレックス, バイオフォーラム 新しい生物学の方向を求めて, 東京(2001)
9. 八木 健(大阪大学) : 遺伝子改変動物研究の概要と展開, 第 78 回日本生理学会大会シンポジウム, 京都(2001)

10. 先崎浩次(生理学研究所)、小川正晴、八木 健：大脳皮質層構造形成機構における CNR ファミリーの分子機能解析，第 78 回日本生理学会大会シンポジウム，京都(2001)

#### 平成 13 年度

##### ①招待、口頭講演 (国内 6 件、海外 2 件)

1. 八木 健(大阪大学)：Somatic mutations of synaptic cadherins(CNR family) in the brain, GRC on Neural Plasticity, Salve Regina University, Newport, RI, USA, 2001.7.16
2. 八木 健(大阪大学)：Somatic mutations of synaptic cadherins(CNR family) in the brain, Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry and American Society for the Neurochemistry, Buenos Aires, 2001.8.26
3. 八木 健(大阪大学)：CNR ファミリーとその脳の機能進化における意味，Neuro 2001(第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会)，国立京都国際会館，2001.9.26
4. 濱田 俊(大阪大学)：シナプスに存在する多様化カドヘリン分子群：CNR ファミリー，Neuro 2001(第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会)，国立京都国際会館，2001.9.28
5. 八木 健(大阪大学)：受容体複合体研究の新しい展開受容体複合体研究の新しい展開，第 74 回日本生化学大会，国立京都国際会館，2001.10.28
6. 八木 健(大阪大学)：脳神経系で発現する CNR/protocadherin ファミリーの解析，研究領域「脳を知る」のシンポジウム”脳神経科学の最先端 2001”，日本科学未来館，2001.11.22
7. 八木 健(大阪大学)：動物行動とゲノム，第 24 回日本分子生物学会，パシフィコ横浜，2001.12.11
8. 八木 健(大阪大学)：Genome structure of CNR family, Tentative meeting program “Genome-Wide Approaches for Developmental Biology using Xenopus”，基礎生物学研究所，2002.2.23

##### ②ポスター発表 (国内 2 件、海外 0 件)

1. 武藤哲司(総合研究大学院大学)：Cell-Adhesion Activity of Cadherin-Related Neuronal Receptor(CNR) Family, 研究領域「脳を知る」のシンポジウム”脳神経科学の最先端 2001”，日本科学未来館，2001.11.22
2. 平山晃斉(総合研究大学院大学)：シナプスに局在する CNR ファミリー遺伝子の転写産物における体細胞突然変異，研究領域「脳を知る」のシンポジウム”脳神経科学の最先端 2001”，日本科学未来館，2001.11.22

#### 平成 14 年度

##### ①招待、口頭講演 (国内 3 件、海外 1 件)

1. 八木 健(大阪大学)：“Diversity of CNR Family Genes in the Brain”，UEHARA MEMORIAL FOUNDATION SYMPOSIUM-2002 “Genomic Science-Towards a New Paradigm，京王プラザインターコンチネンタルホテル，2002/6/4
2. 八木 健(大阪大学)：“Protocadherins in brain development”，“Molecular genetics of morph regulatory process-From stem cells to complex cellular networks”，Max-Planck-Institute for Experimental Medicine Gettingen, Germany, 002/10/12
3. 濱田 俊(大阪大学)：“CNR/プロトカドヘリン遺伝子クラスターとシナプス結合の多様性”，第 25 回日本分子生物学会，パシフィコ横浜，2002/12/11-14
4. 八木 健(大阪大学)：“脳に存在する多様化分子群 CNR/protocadgerin ファミリー”，平成 14 年度基礎生物学研究所共同利用研究会「動物行動プログラムの遺伝・生物学的基盤」，基礎生物学研究所，2002/12/20

②ポスター発表 (国内 8件、海外 5件)

1. 平山晃斉(科学技術振興事業団／大阪大学) : Somatic mutation of synaptic cadherin (CNR family) transcripts in the nervous system, Gordon Conferences, USA, 2002/8/18
2. 長田智治(科学技術振興事業団／大阪大学) : Chromosomal deviations of adult neuronal nuclei using clone technique, Mouse Molecular Genetics Meeting Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2002/8/28
3. 加藤めぐみ(生理学研究所) : 連続核移植による体細胞クローンラット作製の試み, 日本繁殖生物学会, 2002/9/13-15
4. 江角重行(大阪大学) : Variation of synaptic cadherin(CNR) transcripts in a single neuron, Neuroscience MTG, The Orange Country Convention Center, 9800 International Drive, Orland, USA, 2002/11/5
5. 多田基紀(総合研究大学院大学) : Zebrafish CNR family genes: genomic organization and expression during brain development, Neuroscience MTG The Orange Country Convention Center, 9800 International Drive, Orland, USA, 2002/11/5
6. 平山晃斉(科学技術振興事業団) : 中枢神経系における CNR の体細胞突然変異, 第 25 回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 2002/12/11-14
7. 村井真知子(大阪大学) : マウス脳にける相同組み換え修復関連遺伝子群の発現, 第 25 回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 2002/12/11-14
8. 田口祐介(大阪大学) : CNR プロトカドヘリン遺伝子座におけるマウス 15 系統間での多型解析, 第 25 回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 2002/12/11-14
9. 宮崎充弘(大阪大学) : 中枢神経系におけるレトロトランスポジションの可能性を示唆するイントロンレス CNR の検索と解析, 第 25 回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 2002/12/11-14
10. 三木理恵(大阪大学) : 脳機能の個人差を生み出す遺伝的基盤の探索, 第 25 回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 2002/12/11-14
11. 長谷川園子(大阪大学) : マウス脳における CNR ファミリー蛋白質の局在の解析, 第 25 回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 2002/12/11-14
12. 田井佑実(大阪大学) : マウス脳神経系における DNA polymerase の酵素群の発現, 第 25 回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 2002/12/11-14
13. 平林真澄(生理学研究所) : Attempts of Cloning Rats by Serial Nuclear Transplantation, 国際胚移植学会, Aotea Centre, Auckland, New Zealand, 2003/1/11-14

平成 15 年度

①招待、口頭講演 (国内 4件、海外 0件)

1. 八木 健(大阪大学) : Diversity of CNR/protocadherin genes in the brain, International Symposium/Dynamics of Neural Development, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市), 2003/8/10
2. 八木 健(大阪大学) : Diversity of cadherin-related neuronal receptor (CNR) genes in the brain, 第 46 回神経化学学会大会／シンポジウム「ヒトはなぜその行動をとるか」, 新潟コンベンションセンター(新潟市万代島 6-1), 2003/9/25
3. 八木 健(大阪大学) : Diversity of CNR/protocadherin genes in the brain, 第 76 回日本生化学会大会, パシフィコ横浜, 2003/10/18
4. 長田智治(科学技術振興機構) : マウス成体神経細胞核における染色体の異数性と再編成の解析, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003/12/10-13

②ポスター発表 (国内 14件、海外 6件)

1. 平林真澄(生理学研究所) : ラット卵母細胞の活性化方法が円形精子細胞の顕微注入後の産仔率に及ぼす影響, 第 50 回日本実験動物学会, 大宮ソニックシティー, 2003/5/29-31

2. 森下博文(大阪大学) : Diversity of the cadherin-related neuronal receptor /protocadherin family and functions in neural development, Gordon Research Conferences "Neural Plasticity" , Salve Regina University, Newport, RI, USA, 2003/6/22-27
3. 長谷川園子(大阪大学) : Localization of CNR Family Proteins in the Mouse Olfactory System, International Symposium/Dynamics of Neural Development, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市), 2003/8/10
4. 村井真知子(大阪大学) : Expression of genes related to homologous recombination in mouse brain, International Symposium/Dynamics of Neural Development, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市), 2003/8/10
5. 森下博文(大阪大学) : Diversity of the cadherin-related neuronal receptor /protocadherin family and functions in neural development, International Symposium/Dynamics of Neural Development, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市), 2003/8/10
6. 長谷川園子(大阪大学) : Localization of Cadherin-related Neuronal Receptor (CNR) Family Proteins in the Mouse Olfactory System, The 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience, the Morial Convention Center, 900 Convention Center Blvd., New Orleans, LA 70130 USA, 2003/11/8-12
7. 村井真知子(大阪大学) : EXPRESSION OF XRCC2 AND XRCC3 IN MOUSE BRAIN, The 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience, the Morial Convention Center, 900 Convention Center Blvd., New Orleans, LA 70130 USA, 2003/11/8-12
8. 平林真澄(生理学研究所) : 体外培養ラット胚の産仔発生率に対する系統の影響, 日本繁殖生物学会, 帯広市, とかちプラザ, 2003/9/11-15
9. 平林真澄(生理学研究所) : ラット円形精子細胞の顕微授精, 精子細胞の凍結保存法と卵母細胞の活性化法の検討, 日本繁殖生物学会, 帯広市とかちプラザ, 2003/9/11-15
10. 加藤めぐみ(科学技術振興機構) : 外来 DNA 処理した精子・精子細胞の顕微授精によるトランスジェニックラットの作製, 日本繁殖生物学会, 帯広市とかちプラザ, 2003/9/11-15
11. 石井靖幸(科学技術振興機構) : メダカとマウス、ヒト CNR/Pcdh 遺伝子クラスターの比較ゲノム構造解析, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003/12/10-13
12. 河村佳見(大阪大学) : 体細胞クローン技術を用いたマウス神経細胞核における多分化能獲得の検討, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003/12/10-13
13. 牧野初音 : クローンマウス作製による分化神経細胞核における核情報変換の解析, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003/12/10-13
14. 杉野英彦(大阪大学) : ニワトリ CNR/Pcdha 遺伝子クラスターのゲノムシーケンス解析, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003/12/10-13
15. 村田陽二(科学技術振興機構) : 脳神経系における遺伝子クラスター型カドヘリン分子群、CNR/Pcdha と Pcdhg はタンパク質複合体を構成する, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003/12/10-13
16. 森下博文(大阪大学) : The Cadherin-related neuronal receptor / Protocadherin  $\alpha$  family in the developing cortical connectivity, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003/12/10-13
17. 高山貴至(大阪大学) : 睡眠期マウス大脳皮質における網羅的遺伝子発現解析, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003/12/10-13
18. 雲出 佑(大阪大学) : マウス大脳皮質の局所神経回路における CNR/プロトカドヘリンファミリーの発現, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003/12/10-13
19. 小竹康代(大阪大学) : サル CNR/Protocadherin  $\alpha$  遺伝子構造解析による霊長類大脳皮質領野での発現解析, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003/12/10-13
20. 杉野英彦(大阪大学) : ラット CNR/Pcdha 遺伝子クラスターのゲノムシーケンス解析, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003/12/10-13

平成 16 年度

①招待、口頭講演（国内 2 件、海外 0 件）

1. 八木 健(大阪大学) : CNR/プロトカドヘリン遺伝子の多様性 : 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 2004/12/8~11
2. 森下博文(大阪大学), 柴田直樹、海津正賢, 村田陽二、池上貴久, 八木健、樋口芳樹 : Dynamic regulation of axonal CNR/Protocadherin  $\alpha$  family expression in the developing nervous system, 第 42 回日本生物物理学会年会(国立京都国際会議場), 2004/12/13~15

②ポスター発表（国内 20 件、海外 5 件）

1. Isosaka T(伊早坂智子:大阪大学), Hattori K & Yagi T. : NMDA receptors are increased in the hippocampus of heterozygous Reeler mice. Neuro2004, 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会, 大阪国際会議場, 大阪市北区中ノ島, 2004/9/21~23
2. Hattori K(服部功太郎 : 大阪大学), Yagi T & Yuasa S. : Behavioral and psychopharmacological abnormalities of Fyn-deficient mice and their clinical implications. , 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会, 大阪国際会議場, 大阪市北区中ノ島, 2004/9/21~23
3. Umitsu M(海津正賢:大阪大学), Morishita H, Murata Y, Kusano S, Higuchi Y, Ikegami T & Yagi T : Structural and functional characterization of CNR/Pcdh  $\alpha$  family protein. , 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会, 大阪国際会議場, 大阪市北区中ノ島, 2004/9/21~23
4. Morishita H(森下博文 : 大阪大学), Murata Y, Esumi S, Hamada S & Yagi T. : CNR/Pcdh  $\alpha$  family proteins in the developing cortical connectivity. , 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会, 大阪国際会議場, 大阪市北区中ノ島, 2004/9/21~23
5. Hasegawa S(長谷川園子 : 大阪大学), Murata Y, Hamada S & Yagi T. : Differential expression of CNR/Pcdh  $\alpha$  family proteins in the olfactory and vomeronasal nerves. , 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会, 大阪国際会議場, 大阪市北区中ノ島, 2004/9/21~23
6. Esumi S(江角重行 : 大阪大学), Hirayama T, Toyama T, Kazu N, Kitsukawa T & Yagi T. : Variation of CNR/Pcdh  $\alpha$  transcripts in a single neuron. , 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会, 大阪国際会議場, 大阪市北区中ノ島, 2004/9/21~23
7. Kawaguchi M(川口将史 : 大阪大学), Toyama T, Sugino H & Yagi T : The expression pattern of CNR/Pcdh  $\alpha$  isoforms correlates with genomic methylation status. , 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会, 大阪国際会議場, 大阪市北区中ノ島, 2004/9/21~23
8. Tada T(多田基紀 : 大阪大学), Sugino H & Yagi T. : Zebrafish Pcdh family genes: genomic organization and expression during brain development. , 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会, 大阪国際会議場, 大阪市北区中ノ島, 2004/9/21~23
9. Sasaki A(佐々木綾子 : 大阪大学), Hirayama T & Yagi T. : Construction of CNR/ Pcdh  $\alpha$  specific cDNA library, nucleotide sequence and analysis of somatic mutations. , Neuroscience 2004, San Diego Convention Center, 111 West Harbor Drive, San Diego, CA 92101, USA, 2004/10/23~27
10. Morishita H(森下博文 : 大阪大学), Murata Y, Esumi S, Kawaguchi M, Hasegawa S, Seiwa C, Hamada S, Asou H & Yagi T. : DYNAMIC EXPRESSION OF CNR/PCDH  $\alpha$  FAMILY PROTEIN BY GROWING AXONS IN THE DEVELOPING NERVOUS SYSTEM. , Cold Spring Harbor

- Laboratory (Axon Guidance & Neural Plasticity meeting), Cold Spring Harbor, NY, USA, 2004/9/18~22
11. Morishita H(森下博文：大阪大学), Murata Y, Esumi S, Kawaguchi M, Hasegawa S, Seiwa C, Hamada S, Asou H & Yagi T. : DYNAMIC EXPRESSION OF CNR/PCDH $\alpha$  FAMILY PROTEIN BY GROWING AXONS IN THE DEVELOPING NERVOUS SYSTEM, Picower-RIKEN Symposium 2004, The Wong Auditorium at the Tang Center, MIT, Cambridge, MA, USA, 2004/9/18~22
  12. 金子涼輔(生理学研究所)、加藤めぐみ、石川綾子、平林敬浩、濱田 俊、八木 健、平林真澄 : アトピー性皮膚炎モデルラットの樹立と病態解析 , 第 21 回日本疾患モデル学会総会, 京都大学芝蘭会館, 2004/11/11~12
  13. Morishita H(森下博文：大阪大学), Murata Y, Esumi S, Kawaguchi M, Hasegawa S, Seiwa C, Hamada S, Asou H & Yagi T. : Dynamic regulation of axonal CNR/Protocadherin $\alpha$  family expression in the developing nervous system. , 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 2004/12/8~11
  14. 川口将史(川口将史：大阪大学)、遠山知子、八木 健 : 脳神経系で発現する多様化膜分子 CNR/ Pcdh $\alpha$  の遺伝子制御機構の解析, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 2004/12/8~11
  15. Hattori K(服部功太郎：大阪大学), Fukuzako H, Hamada S & Yagi T. : Fyn is involved in psychopharmacological function and altered in schizophrenia patients. , 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 2004/12/8~11
  16. Umitsu M(海津正賢：大阪大学), Morishita H, Murata Y, Kusano S, Shibata N, Higuchi Y, Ikegami T & Yagi T. : Structure-function relationship of CNR/Pcdh $\alpha$  EC1 protein. , 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 2004. 12. 8~12. 11
  17. 工藤静香(大阪大学)、平林真澄、服部功太郎、濱田 俊、柳川右千夫、八木 健 : 皮質層特異マーカー遺伝子を用いたマウス大脳皮質形成機構の解析, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 2004/12/8~11
  18. Tada M(多田基紀：大阪大学), Momoi A, Furutani-Seiki M, Hamada S & Yagi T. : Zebrafish Pcdh family genes: genomic organization and functional analysis during brain development. , 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 2004/12/8~11
  19. 内村有邦(大阪大学), 古澤 満, 八木 健 : 生殖系列において変異型 DNA ポリメラーゼ  $\delta$  を過剰発現させたトランスジェニックマウスの解析, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 2004/12/8~11
  20. Sasaki A(佐々木綾子：大阪大学), Hirayama T & Yagi T. : Construction of CNR/Pcdh $\alpha$  specific cDNA library, nucleotide sequence and analysis of somatic mutations. , 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 2004/12/8~11
  21. 福田絵美(大阪大学)、濱田 俊、平林敬浩、八木 健 : CNR/ Pcdh $\alpha$  splicing variant 遺伝子変換マウスの表現型解析, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 2004/12/8~11
  22. Isosaka T(伊早坂智子：大阪大学), Hattori K & Yagi T. : NMDA-receptor proteins are upregulated in the hippocampus of heterozygous Reeler mice. , 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 2004/12/8~11
  23. 石井靖幸(慶應大学)、浅川修一、山崎 悟、吉岡 基、八木 健、清水信義 : バンドウイルカ BAC ライブラリーの作製と比較ゲノム解析・進化発生学への利用, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 2004/12/8~11
  24. Umitsu M(海津正賢：大阪大学), Morishita H, Murata Y, Kusano S, Shibata N, Higuchi Y, Ikegami T & Yagi T. : Structure-function relationship of CNR/Pcdh $\alpha$  EC1 protein. , Gordon Research Conferences (Fibronectin, Integrins & Related Molecules) , West Kingston, RI, 02892-0984 USA , 2005/1/30~2/4
  25. Morishita H(森下博文：大阪大学), Umitsu M, Murata Y, Shibata N, Udaka K, Higuchi

Y, Akutsu H, Ikegami T & Yagi T. : STRUCTURAL DIVERSITY OF CADHERIN SUPERFAMILY IN THE NERVOUS SYSTEM REVEALED BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE ANALYSIS OF CNR/PROTODHHERIN ALPHA FAMILY., *Imaging Neurons & Neural Activity, New Methods, New Results 2005*, 2005/3/10~14

平成 17 年度

①招待、口頭講演 (国内 3 件、海外 4 件)

1. 八木 健(大阪大学) : Diversity of CNR/protocadherin family in the brain., 神経科学会サテライトシンポジウム, パシフィコ横浜 : 横浜市西区みなとみらい, 2005/7/25
2. 八木 健(大阪大学) : 多様化膜分子群の分子進化と脳機能での働き, 第 7 回日本進化学会東北大会, 東北大学川内キャンパス、宮城県仙台市, 2005/8/28
3. Hasegawa S (長谷川園子 : 大阪大学), Hamada S, Kumode Y, Esumi, S, Katori S, Uchiyama Y, Hirabayashi T, Mombaerts P, and Yagi T : Protocadherin- $\alpha$  family regulates axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system., 国際発牛生物学会 The 15th International Society of Developmental Biologists Congress, Sydney Convention & Exhibition Ctr., 2005/9/3~7
4. Yagi T (八木 健 : 大阪大学) : Diversity of CNR/protocadherin family in the brain, Robson Lecture Theatre, Hanson Institute in Adelaide, Australia, 2005/9/9
5. 八木 健(大阪大学), 服部功太郎 : Divers CNR/Protocadherin- $\alpha$  family and Fyn-tyrosine kinase for Schizophrenia., 第 48 回日本神経化学会(福岡)大会, 2005/9/29
6. Yagi T((八木 健 : 大阪大学) : The biology and practice of mammalian cloning: A reassessment., The Banbury Center, Cold Spring Harbor Laboratory, 2005/11/8-11
7. 八木 健((八木 健 : 大阪大学) : Diversity of protocadherin family in the brain., The Annual Symposium of the Center for Genomic Regulation, "CONNECTING THE GENOME WITH DISEASE", Barcelona, Spain, 2005/12/1-2

②ポスター発表 (国内 13 件、海外 5 件)

1. Kawaguchi M(川口将史:大阪大学), Tohyama T & Yagi T. : Expression pattern of CNR/Pcdh $\alpha$  isoforms correlates with their genomic methylation status., Gordon Research Conferences "Developmental Biology" Proctor Academy, Andover, NH, USA, 2005/6/19~24
2. Katori S(香取将太 : 大阪大学), Esumi S, Hamada S, Takeshi Yagi T. : Expression of *Pcdh $\alpha$*  and *Pcdh $\gamma$*  mRNAs in the adult mouse brain., Gordon Research Conferences "Cell Contact & Adhesion" Proctor Academy, Andover, NH, USA, 2005/6/26~7/1
3. Morishita(森下博文 : 大阪大学) H, Umitsu M, Murata Y, Shibata N, Udaka K, Higuchi Y, Akutsu H, Ikegami T, Yagi T: Structure of CNR/Protocadherin $\alpha$  first cadherin domain reveals diversity across cadherin families, 第 28 回神経科学大会, パシフィコ横浜, 横浜市西区みなとみらい, 2005/7/26~28
4. Kawaguchi M(川口将史 : 大阪大学), Tohyama T & Yagi T: Analysis for expressional regulation of CNR/Pcdh $\alpha$  isoforms., 第 28 回日本神経科学大会サテライトシンポジウム「こころの分子基盤とモデル動物」, パシフィコ横浜, 横浜市西区みなとみらい, 2005/7/24~25
5. Hasegawa S(長谷川園子 : 大阪大学), Hamada S, Kumode Y, Esumi S, Mombaerts P, and Yagi T: Axonal projection of primary olfactory neurons in the CNR/Protocadherin- $\alpha$  gene-targeted mice., 横浜市西区みなとみらい, 2005/7/24~25 (サテライトシンポジウム) & 2005/7/26~28 (神経科学大会)
6. Kawamura Y(河村佳見 : 大阪大学), Kato H, Esumi S & Yagi T. : Variations of *Protocadherin $\alpha$*  transcripts in a single neuron., 横浜市西区みなとみらい,

- 2005/7/24~25 (サテライトシンポジウム)&2005/7/26~28(神経科学大会)
7. Fukuda E(福田絵美:大阪大学), Hamada S, Miyakawa T, Hirabayashi T, Yagi T.: Phenotypic analysis of CNR/Protocadherin $\alpha$  gene-targeting mice., 第28回神経科学大会, パシフィコ横浜, 横浜市西区みなとみらい, 2005/7/24~25(サテライトシンポジウム)&2005/7/26~28(神経科学大会)
  8. Esumi S, Kawamura Y, Kumode Y, Kato H, Hirabayashi T, & Yagi T. (八木 健:大阪大学): Variations of CNR/Protocadherin- $\alpha$  transcripts in a single Purkinje neuron., 国際発生生物学会, The 15th International Society of Developmental Biologists Congress, Sydney Convention & Exhibition Ctr., 2005/9/3~7
  9. Fukuda E(福田絵美:大阪大学), Hamada S, Miyakawa T, Hirabayashi T, Yagi T.: Down regulation of CNR/Protocadherin- $\alpha$  family enhanced fear-related spatial learning in mice., Neuroscience 2005, Washington DC, 2005/11/12~16
  10. Kawamura Y(河村佳見:大阪大学), Kato H, Esumi S, Yagi T.: Variations of *Protocadherin $\alpha$*  transcripts in a single neuron., Neuroscience 2005, Washington DC 2005/11/12~16
  11. 森下博文(大阪大学), 海津正賢, 村田陽二, 柴田直樹, 宇高恵子, 樋口芳樹, 阿久津秀雄, 山口 徹, 池上貴久, 八木 健: カドヘリンの多様な接着レパートリー: プロトカドヘリンの蛋白質立体構造からの示唆, 第28回日本分子生物学会年会, ヤフードーム(福岡ドーム), 2005/12/7~10
  12. 内村有邦(大阪大学), 八木 健, 古澤満: 複数の変異が同時に生じることと不均衡変異との関連, 第28回日本分子生物学会年会, ヤフードーム(福岡ドーム), 2005/12/7~10
  13. 川口将史(大阪大学), 遠山知子, 田口祐介, 八木 健: 脳神経系で発現する多様化膜分子 CNR/Pcdh $\alpha$ の遺伝子制御機構の解析, 第28回日本分子生物学会年会, ヤフードーム(福岡ドーム), 2005/12/7~10
  14. Hasegawa, S(長谷川園子:大阪大学), Hamada, S, Kumode, Y, Esumi, S, Katori, S, Uchiyama, Y<sup>3</sup>, Hirabayashi, T, Mombaerts, P, and Yagi, T: Protocadherin-a family regulates axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system.: 第28回日本分子生物学会年会, ヤフードーム(福岡ドーム), 2005/12/7~10
  15. 金子涼輔(大阪大学), 田口祐介, 八木健: 未成熟終止コドンを含む CNR/Protocadherin $\alpha$  mRNA 量の調節機構演題(英), Regulation of CNR/Protocadherin $\alpha$  mRNA harboring PTC, 第28回日本分子生物学会年会, ヤフードーム(福岡ドーム), 2005/12/7~10
  16. Kawamura Y(河村佳見:大阪大学), Kato H, Esumi, S, Yagi T: Variation of CNR/Pcdh $\alpha$  transcripts in a single neuron, 第28回日本分子生物学会年会, ヤフードーム(福岡ドーム), 2005/12/7~10
  17. 加藤宏幸(大阪大学), 河村佳見, 江角重行, 八木 健: マウス小脳プルキンエ細胞における CNR/プロトカドヘリンファミリーの発現パターンの解析, 第28回日本分子生物学会年会, ヤフードーム(福岡ドーム), 2005/12/7~10
  18. 浅川修一(慶応義塾大学), 石井靖幸, 佐々木貴史, 清水厚志, 多田基紀, 八木 健, 清水信義: 脊椎動物における CNR/Pcdh 遺伝子クラスターの進化, 第28回日本分子生物学会年会, ヤフードーム(福岡ドーム), 2005/12/7~10



(3) 特許出願

①国内出願 (3 件)

1. 発明の名称：統合失調症の診断方法  
発明者：八木 健、服部功太郎、福迫 博  
出願人：科学技術振興機構  
出願日：平成 15 年 7 月 31 日  
出願番号：特願 2003-284446
  
2. 発明の名称：核移植技術による胚性幹細胞  
発明者：八木 健、長田智治  
出願人：科学技術振興機構、国立大学法人大阪大学  
出願日：平成 17 年 3 月 17 日  
出願番号：特願 2005-77327
  
3. 発明の名称：プロトカドヘリンの新規機能ドメイン  
発明者：八木 健、池上貴久、森下博文、海津正賢  
出願人：国立大学法人大阪大学  
出願日：平成 17 年 4 月 14 日  
出願番号：特願 2005-117294

②海外出願 (0 件)

記載事項なし

(4) 受賞等

記載事項なし

(5) その他特記事項

記載事項なし

## 6. 研究期間中の主な活動

### (1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H13. 4. 16-17	第一回八木研究チーム仕事報告会	大阪大学細胞生体工学センター	20名	プロジェクトの目的と研究の方向性について討議 各々の研究状況報告、研究打ち合わせ及び情報交換
H13. 12. 21	第二回八木研究チーム仕事報告会	大阪大学細胞生体工学センター	25名	全ての研究グループ参加のもと1年間の研究総括と今後の方針について討議 各研究グループの研究状況報告、研究打ち合わせ及び情報交換
H14. 4. 12-13	第三回八木研究チーム仕事報告会	大阪大学大学院生命機能研究科	27人	各研究グループの研究進捗状況を把握し、情報・意見交換を行った。
H14. 12. 26-27	第四回八木研究チーム仕事報告会	大阪大学大学院生命機能研究科	31人	各研究グループの研究進捗状況を把握し、情報・意見交換を行った。
H15. 4. 25-26	第五回八木研究チーム仕事報告会	大阪大学大学院生命機能研究科	35人	各研究グループの研究進捗状況を把握し、情報・意見交換を行った。
H15. 12. 19-20	第六回八木研究チーム仕事報告会	岡崎国立共同研究機構	35人	各研究グループの研究進捗状況を把握し、情報・意見交換を行った。

### (2) 招聘した研究者等

記載事項なし

## 7. 結び

本研究のサポートを受け、ハワイ大学、慶應義塾大学との本格的な共同研究を推進することができた。また、ゲノム構造解析用のシーケンサーを導入、マウス飼育ラックをセットアップすることにより、クラスター型カドヘリンのゲノム構造と機能の解析を強く推進することができた。単一神経細胞レベルでの発現解析はシーケンサー導入により効率よく進めることができた。また、大学院生や若手研究者の学会発表や研究を推進することができ、独立したポジションを確保する研究員や、他の研究機関へ助手、研究員として就職する大学院生の育成ができた。サブ研究グループとして参加したハワイ大学グループとはクローンマウス作製技術、慶應義塾大学グループとはBACライブラリー作製と解析技術、生理学研究所グループとはゲノム機能解析の為の遺伝子変換マウス作製技術、福岡女子大学グループとは遺伝子変換マウス解析、三菱化学研究所グループとはクローンES細胞株樹立と解析を行い、緊密で協力的な研究体制を推進することができた。本研究の中間評価は厳しいものであり、体細胞レベルでのゲノム変換へのアプローチ、クローンマウス作製についての見直しを行ったが、最終的には、本研究の目標であったクラスター型カドヘリンのゲノム構造と機能から脳神経系にある多様性の分子的

基盤を明らかにするアプローチを推進することができたのではないかと考えている。

脳は複雑なシステムであり、この様なシステムをつくる原理を生物学的に理解して行くことが私たちの研究の方向性である。この様な研究の方向性の中で、本研究プロジェクトの目標は、脳神経系にある多様性をクラスター型カドヘリンのゲノム構造と機能から解析して行くことであった。また、クラスター型カドヘリンを中心的な研究の方向にしながら、新規な技術を取り入れて研究を推進した。1998年に世界を驚かせたクローンマウス作製法の神経細胞核への応用、単一の神経細胞核の情報を解析するもくろみ、ヒトゲノムプロジェクトが進行する中で次世代に必須となる種々の脊椎動物種についての BAC ライブラリーの作製と解析を研究チームに加え、研究を推進してきた。今までにコラボレーションが少なかった脳研究とクローン研究とゲノム研究との融合的発展を本研究プロジェクトにより推進し、今までにない融合研究の方向性が生まれたのではないかと考えている。また、研究開始当時、世界的な関心事であった脳神経系における体細胞レベルでのゲノム構造変換の可能性追求についても、クローンマウス作製、ゲノム構造解析を精力的に進めることができ限界と可能性を示す成果が得られたと考えている。特に、分化した神経細胞核を用いたクローンマウス作製における高頻度な発生異常、この発生異常が ES 細胞株を用いることによりキャンセルする結果は、神経細胞が分化する過程でゲノム情報変換をおこなっている可能性を示唆した。この研究成果は、招聘された Cold spring harbor での会議でも今後の課題として論議となった。また、クラスター型カドヘリンが、個々の神経細胞で異なる発現パターンを持つことにより、神経細胞の多様性と特殊性に関わること、またこの遺伝子制御機構が今までにない新しい染色体ゲノムレベルでのメカニズムによりもたらされている可能性を明らかにすることができた。

更に、このクラスター型カドヘリンのゲノム構造の多様性は、系統発生レベル、マウスやヒト集団レベルでも興味深く、脳の進化を考える中でも興味深い結果となったと考えている。本研究により、ゼノパストロピカリス、イルカの BAC ライブラリーも世界で始めて作製することができ、今後のゲノム解析についての大きなツールになると考えている。また、遺伝子変換マウスの作製や解析では、クラスター型カドヘリンの脳の形成や機能に関する役割が明らかになってきており、ここで報告した Fyn チロシンリン酸化酵素のドーパミン作用との関連性や統合失調症との関わりに加えて、今後 CNR/プロトカドヘリンや Fyn の脳機能へ関与がより具体的に明らかになってくると考えている。このように本研究によるクラスター型カドヘリンのゲノム構造と解析のアプローチにより、脳の多様性をもたらす分子的基盤についての大きな方向性を示すことができたのではないかと考えている。

本戦略的創造推進事業は、新たな研究分野を開拓するチャンスを与えてくれるものであり、私のグループも大きなチャンスを与えて頂いた。この研究への評価は全て研究代表者の責任であるが、本研究を推進したメンバーの辛抱と多大なる努力により生まれたものである。チャンスと協力をいた戦略的創造推進事業に感謝すると共に、本研究グループのメンバーにこころから感謝したい。今後は、本研究で得られた研究成果を更に発展させ、脳や心への理解、ヒト疾患へのアプローチを通して、社会に成果を還元してゆく努力をしてゆきたいと考えている。