

「ゲノムの構造と機能」
平成12年度採択研究代表者

八木 健

(大阪大学細胞生体工学センター 教授)

「クラスター型カドヘリンのゲノム構造、機能の解析」

1. 研究実施の概要

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

2. 研究実施内容

a) 脳神経系での体細胞レベルでのCNRの遺伝的変異の蓄積

CNRのゲノム構造は可変領域と定常領域よりなる。この可変領域と定常領域がどのようなメカニズムで連結しているのかを確かめる為に、C57BL/6とDBA/2で遺伝子配列の異なるCNR3の可変領域を用いて、C57BL/6とDBA/2のF1マウスでの連結パターンを解析した。その結果、成体マウスで85%は同じ染色体上の可変領域と不変領域でのシス型の連結が認められるものの、15%は染色体の異なるトランス型であった。この結果は、CNRの発現にはシスのスプライシング以外のメカニズムが関与している可能性が示唆された。

また、CNR3 mRNAの遺伝子配列を解析した結果、興味深いことに突然変異の

蓄積が体細胞レベルでおこなっていることが明らかとなった。この突然変異は、脳の発達段階で蓄積されており、トランスの転写産物での変異率が高かった。このことは、突然変異の導入とトランスの転写産物の産生メカニズムとの関連性が示唆された。また、突然変異によるアミノ酸配列の変換を解析した結果、アミノ酸配列変換がCNR3の第一カドヘリンモチーフでのみ高く認められた。これらの結果は、脳神経系での初めての体細胞レベルでの遺伝的変異を示唆したものであり、神経回路形成や記憶のメカニズムを考える上で興味深いものである。

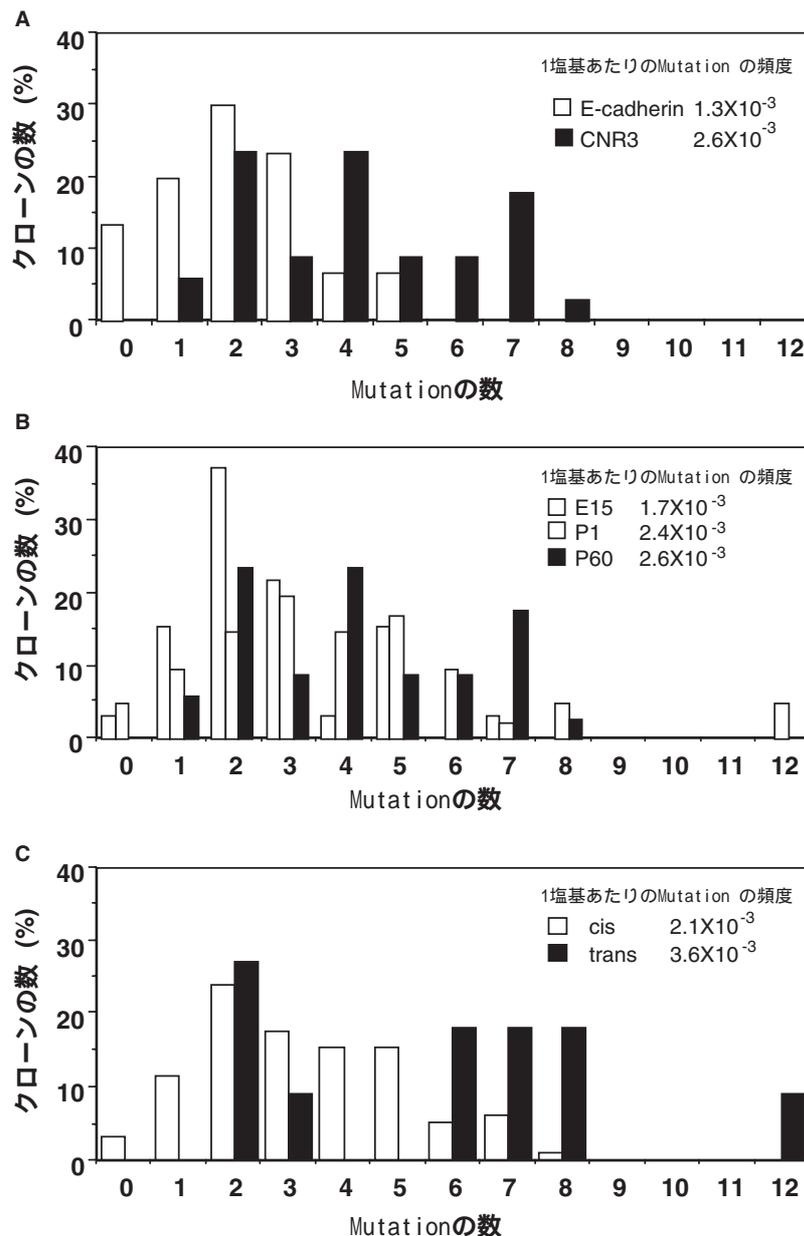


図1 マウス大脳皮質由来のCNR3の転写産物の各クローンごとの突然変異の数と分布
 A . 生後60日目のEカドヘリンとCNR3の転写産物の比較。 B . 胎生15日目、生後1日目、生後60日目のCNR3転写産物の比較。 C . cis型、trans型の転写産物の比較。

期待値 (R/S)	SIG	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5	EC6	TM	vCP	cCP
P60										
R	3	15	5	4	5	6	8	1	4	11
S	0	1	10	4	4	2	6	1	3	8
R/S	-	15.0	0.5	1.0	1.3	3.0	1.3	1.0	1.3	1.4

	Total clones	R/S	一塩基当たりのmutationの頻度 ($\times 10^{-3}$)								
			SIG			EC1			EC2		
			R	S	R/S	R	S	R/S	R	S	R/S
E15	32	4.2	0.6	0.0	-	1.0	0.1	9.0	1.3	0.5	2.8
P1	41	3.8	1.9	0.2	8.0	1.8	0.3	5.2	1.5	0.6	2.5
P60	34	1.9	1.4	0.0	-	1.9	0.2	10.0	0.9	1.4	0.6

b) Reelin結合しないCNRc1とc2の遺伝子構造の解析

CNRファミリーの遺伝子クラスターにおいてもっとも3'側にあるCNRのc1とc2は遺伝子配列がCNR1-8と異なり、Reelin結合部であるEC1領域が保存されていない。このファミリーの発現様式を解析したところ、CNR c1とc2は、CNR1-8と同様の定常領域と連結しており、スプリングヴァリアントであるA型とB型も同様に発現していることが明らかとなった。また、これらの脳発達段階での発現様式はCNR1-8とは微妙に異なっていた。次に、Reelinとの結合活性を測定したところ、双方共にReelinとは結合活性を示さないことが明らかとなり、CNR c1とc2はCNR1-8とは異なった分子機能をもつ遺伝子であること示唆された。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

H. Sugino, S. Hamada, R. Tasuda, A. Tuji, Y. Matsuda, M. Fujita and T. Yagi: Genomic organization of the family of CNR cadherin genes in mice and humans. *Genomics* 63, 75-87, 2000.

Y. Yamazaki, T. Yagi, T. Ozaki and K. Imoto: In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker. *J. of Experimental Zoology* 286, 212-218, 2000.

T. Yagi and M. Takeichi: Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes & Development* 14, 1169-1180, 2000.

Y. Shima, T. Yagi, Y. Isojima, N. Okumura, M. Okada and N. Nagai: Changes in circadian period and morphology of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus in fyn kinase-deficient mice. *Brain Res.* 870, 36-43, 2000.

H. Kitazawa, A. Katoh, T. Yagi and S. Nagao: Dynamic characteristics and adaptability of reflex eye movements of Fyn kinase-deficient mice. *Neurosci.*

Lett. 280, 179-182, 2000.

C. Seiwa, I. Sugiyama, T. Yagi and H. Asou : Fyn tyrosine kinase participates in the compact myelin sheath central nervous system. *Neurosci. Res.* 37, 21-31, 2000.

G-Z. Huang, H. Ujihara, S. Takahashi, H. Kaba, T. Yagi and S. Inoue : Involvement of complexin II in synaptic plasticity in the CA 1 region of the hippocampus : The use of complexin II-lacking mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 84, 179-187, 2000.

T. Ito, M. Kagoshima, Y. Sasaki, C. Li, N. Udaka, T. Kitukawa, H. Fujisawa, M. Taniguchi, T. Yagi, H. Kitamura and Y. Goshima : Repulsive axon guidance molecule Sema3A inhibits branching morphogenesis of fetal mouse lung. *Mechanisms of Development* 97, 35-45, 2000.

E. Kawase, Y. Yamazaki, T. Yagi, R. Yanagimachi and R.A. Pedersen : Mouse embryonic stem (ES) cell lines established from neuronal cell-derived cloned blastocysts. *Genesis* 28, 156-163, 2000.

M. Zhen-tong, M. Xiao-feng, T. Yagi and S. Yamagishi : Impairment of conditioned avoidance response in Fyn-kinase deficient mice. *Chin J Neurosci* 16, 293-298, 2000.

T. Hirayama, H. Sugino and T. Yagi : Somatic mutations of synaptic cadherin (*CNR* family) transcripts in the nervous system. *Genes to Cells* 6, 151-164, 2001.

J. Nakahara, K. Tan-Takeuchi, C. Seiwa, T. Yagi, S. Aiso, K. Kawamura and H. Asou : Related Articles Myelin basic protein is necessary for the regulation of myelin-associated glycoprotein expression in mouse oligodendroglia. *Neurosci Lett.* 298, 163-166, 2001.

K. Nakamura, T. Manabe, M. Watanabe, T. Mamiya, R. Ichikawa, Y. Kiyama, M. Sanbo, T. Yagi, Y. Inoue, T. Nabeshima, H. Mori and M. Mishina : Related Articles 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.

Y. Takei, S. Hamada, K. Senzaki, T. Mutoh, H. Sugino and T. Yagi : Two novel CNRs from the CNR gene cluster have molecular features distinct from those of CNR 1 to 8. *Genomics* 72, 321-330, 2001.

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

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

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

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)

八木健編：ジーンターゲティングの最新技術、羊土社、2000