

平成 23 年 3 月 24 日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2005 ～ 2009  
 課題番号：17024034  
 研究課題名（和文） CNR／プロトカドヘリン分子群を用いた脳システム形成と制御の解析  
 研究課題名（英文） Analyses for regulation of brain system by using CNR/protocadherin molecules  
 研究代表者  
 八木 健（YAGI TAKESHI）  
 大阪大学・大学院生命機能研究科・教授  
 研究者番号：10241241

## 研究成果の概要（和文）：

脳は複雑なシステムであり、莫大な数の神経細胞が個性をもって活動することにより機能を生みだしている。本研究は、脳にある個々の神経細胞の個性をもたらす分子メカニズムを明らかにし、この神経細胞の個性によりもたらされる神経回路形成メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、多数のメンバーからなる CNR/プロトカドヘリン遺伝子が、個々の神経細胞で異なった組み合わせで発現をしていることを明らかにすることに成功した。また、CNR/プロトカドヘリン遺伝子が、正確な神経回路形成に必要なものであることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

The brain is a complex system, and is composed of enormous number of neurons, which have individual activity. To understand mechanism of generation and regulation of the complex brain system, we try to examine molecular mechanisms for acquiring neuronal individuality and for generating neural networks in the brain. Here we revealed that about 50 members of CNR/protocadherin genes are differentially expressed in individual neurons, and their expressions are random and combinatorial in each neuron. Also molecules of CNR/protocadherin have significant function for generating correct neural networks during brain development.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2005年度	25,100,000	0	25,100,000
2006年度	24,100,000	0	24,100,000
2007年度	23,200,000	0	23,200,000
2008年度	23,900,000	0	23,900,000
2009年度	24,300,000	0	24,300,000
総 計	120,600,000	0	120,600,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学

キーワード：カドヘリン、遺伝子クラスター、神経細胞、神経回路、多様性

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の脳システムは莫大な数の神経細胞より構築されており、それぞれの神経細胞が多様化している。この神経細胞の多様化に関わる分子群を同定し、脳システム形成に関わる分子機能を明らかにすることは、脳システム形成と制御の原理を解明して行く上で意義の高いものとなる。これまでに嗅神経細胞において発現する多様化分子群—匂い受容体—が単離・同定され、この匂い受容体の遺伝子変換マウスを用いた解析により、同一匂い受容体を発現する嗅神経細胞が特定の嗅球糸球体に神経投射していることなど、神経回路形成における新たな分子メカニズムが明らかになってきた。しかし、これまでに中枢神経系の神経細胞において、このような多様化膜分子群を用いた研究は十分になされていなかった。そこで本研究では、中枢神経系の神経細胞で発現する多様化膜分子群、CNR/プロトカドヘリン分子群に注目して研究を行った。CNR/プロトカドヘリンは、ゲノム DNA 上で遺伝子クラスターを形成し、個々の神経細胞で異なった遺伝子発現をしていること、タンパク質が神経軸索やシナプス領域に局在することが示されている。本研究では、CNR/プロトカドヘリンの神経細胞の多様化、神経回路形成への役割を明らかにすることを目標に、遺伝子変換マウスを用いた解析を行い、ヒトの脳システムの解明をも視野に入れて、哺乳動物の脳システム形成と制御に関わる新たな分子的基盤の解析を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳神経系で発現する多様化膜分子群、CNR/プロトカドヘリンファミリーに注目して、脳システム形成における神経細胞の多様化、神経回路形成に関わる新たな分子メカニズムの解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、CNR/プロトカドヘリン遺伝子に注目し、遺伝子変換マウスの作製と、遺伝子発現、分子生物学、生化学、組織学、行動学についての解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) CNR/プロトカドヘリンファミリーの単一プルキンエ細胞における差次的発現と新たな遺伝子制御メカニズムの発見

小脳プルキンエ細胞を用いた単一神経細胞遺伝子発現解析系を新たに開発した (Esumi et al, 2006)。この系を用いて単一プルキンエ細胞における CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  と

$\gamma$  遺伝子クラスターの遺伝子発現の解析を行った。その結果、個々のプルキンエ細胞において異なって発現する  $\alpha$  アイソフォームが明らかとなり、これらのアイソフォームは単一細胞中の対立染色体ごとに独立した遺伝子制御を受けていることが明らかとなった (図1、Esumi et al, 2005)。更に、 $\gamma$  遺伝子クラスターについて解析した結果、 $\alpha$  遺伝子クラスター同様、個々のプルキンエ細胞での差次的発現と対立染色体ごとの遺伝子制御が明らかになった (Kaneko et al 2006)。

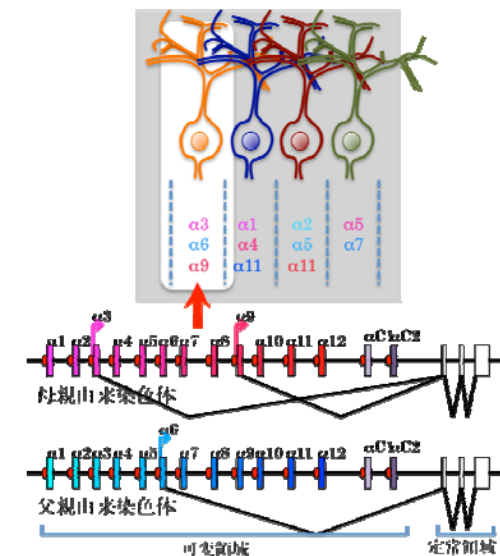


図1 個々の神経細胞での異なる遺伝子発現

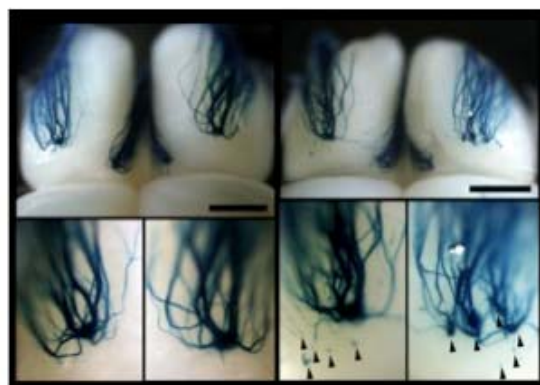
個々の神経細胞で異なった可変エクソンの発現。対立遺伝子(母親と父親由来染色体)において遺伝子クラスターごとに独立した遺伝子発現が認められる。上図は、近傍の4つの神経細胞が、別々の $\alpha$ アイソフォームを発現している。下図は、1つの神経細胞での対立遺伝子の発現様式。

$\alpha$  と  $\gamma$  アイソフォームはタンパク質レベルで複合体を形成していることが明らかになっており、個々のプルキンエ細胞で異なる多様化膜タンパク質複合体を形成していると考えられる。また、 $\alpha$  と  $\gamma$  遺伝子クラスターにおける染色体レベルでの遺伝子発現制御は、今までにない新たな遺伝子制御機構であることから、脳システム形成における個々の神経細胞の多様化をもたらす分子メカニズムとして興味深い。

(2) 神経回路形成における CNR/プロトカドヘリンファミリー分子機能の解析

CNR/プロトカドヘリン  $\alpha$  タンパク質は、神経回路形成過程での軸索やシナプス領域に局在する。この  $\alpha$  ファミリーの神経回路形成における分子機能を解析する為に、 $\alpha$  遺伝子クラスターにおける共通領域を欠損したマウスの作製を行った。この  $\alpha$  欠損マウスにお

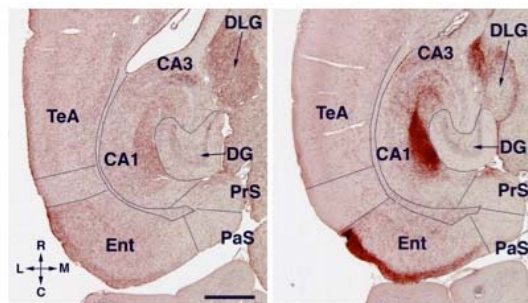
いて M71、P2、MOR23 匂い受容体を発現する嗅神経の軸索投射の解析を行ったところ、嗅神経の嗅球糸球への収束の異常、異所的な投射異常が認められた。また、この異常は成体になるまで維持されていた。これらの結果より、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ が正確な嗅神経回路形成において必須であることが明らかになった (図2、Hasegawa et al 2008)。



野生型マウス  $\alpha$  定常領域欠損マウス  
 図2 CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  定常領域欠損マウスでの嗅神経軸索投射異常  
 CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  定常領域欠損マウスでは、特異的な匂い受容体を発現している嗅神経の異所的な投射異常が認められた。CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  が正確な嗅神経軸索投射に必須であることが明らかとなった。

### (3) CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ のセロトニン神経投射における役割

CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  の中枢神経系における機能を明らかにする目的で、更に $\alpha$  欠損マウスの解析を行った。In situ ハイブリダイゼーション法による解析の結果、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  は縫線核にあるセロトニン神経で特に強く発現していることが明らかとなった。そこで $\alpha$  欠損マウスにおけるセロトニン神経の解析を行ったところ、通常の成体マウスでは広範にほぼ均一に分布してい



野生型マウス  $\alpha$  定常領域欠損マウス  
 図3 CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  定常領域欠損マウスでのセロトニン神経軸索投射の異常  
 CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  定常領域欠損マウスでは、セロトニン神経投射領域での異常が認められた。図はセロトニントランスポーターによるセロトニン神経の免疫染色パターンを示す。 $\alpha$  定常領域欠損マウスでは、セロトニン神経に広範な広がりがなく、濃淡が顕著に認められた。

るセロトニン神経軸索が、 $\alpha$  欠損マウスでは投射の分布が大きく乱れていた。この異常は、成体マウスの大脳皮質、海馬、視床、線条体、嗅球など多くの脳領域で認められており、セロトニン神経の最終標的領域で特に顕著であった。これらの結果より、セロトニン神経の最終標的領域における広範で均一な神経支配に CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  が必須であることが明らかとなった (図3、Katori et al 2009)。セロトニンは、不安、摂食、概日リズム、うつ病などに関与し、脳幹の縫線核にあるセロトニン神経細胞から脳全体に軸索を広範に分岐させ神経支配を行っている。CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  による新たなセロトニン神経の投射メカニズムが明らかになったことより、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  とヒト精神神経疾患との関係についても研究が進展して行くことが期待される。

### (4) CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 定常領域欠損マウスの行動異常の解析

CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  定常領域欠損マウスを用いて網羅的な行動異常の解析を行った。その結果、運動、感覚、不安行動などでは大きな異常が認められないものの、文脈依存的な恐怖条件付け学習と8本放射状迷路での空間ワーキングメモリーにおいて異常な亢進が認められた。また、海馬体におけるセロトニン量の亢進が認められた。更に、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  定常領域のAタイプ及びBタイプ欠損マウスについて調べたところ、これらの異常が $\alpha$  定常領域のAタイプに由来するものであることが明らかとなった (Fukuda et al 2008)。これらの結果により、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  が哺乳動物の行動制御に関わる遺伝的基盤であることが明らかとなった。

### (5) 遺伝子クラスター構造変換マウス作製による遺伝子発現制御機構の解析

これまでの研究により、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  のメンバーが個々の神経細胞において異なった発現様式をしており、神経細胞の個性に関わる分子群であることが示唆されている。本研究では、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  遺伝子クラスター構造を変換させたマウスの作製を行い、遺伝子クラスター構造と遺伝子制御機構との関連性の解析を行った。 $\alpha$  メンバーには、大きく2種類の発現パターン、個々の神経細胞で異なる発現 (確率的発現) と、神経細胞のほぼ全てで発現 (恒常的発現) が示唆されている。遺伝子クラスターの数を変換させたマウスにおいても、この2種類の発現パターンが維持されており、最も下流にあるメンバーが必ず恒常的な発現パターンを示すことが明らかになった (図4)。また、遺伝子クラスターの数を減少させても、 $\alpha$  メ



ンバー全ての発現量は変わらず、残った $\alpha$ メンバーの発現量、各神経細胞における発現頻度が増加した。これらの結果は、個々の神経細胞での異なる発現パターンが、遺伝子クラスター数に依存した確率的な制御であることを示すものである。この様な確率的な遺伝子制御が、脳システム形成過程における個々の神経細胞で存在していることは、これまでに全く知られておらず、個々の神経細胞の多様化と脳の複雑な神経回路をもたらす遺伝的プログラムを考える上で興味深いものである (Noguchi et al 2009)。

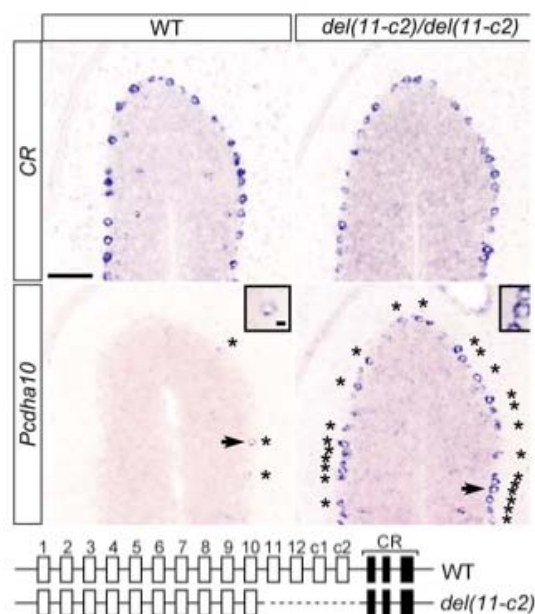


図4  $\alpha$  遺伝子クラスター変換マウスでの発現解析  
 $\alpha 11 \sim \alpha C2$ を欠損させた( $del(11-c2)$ )マウスでは、野生型マウスで確率的に発現していた $\alpha 10$ が恒常的な発現パターンに変換した。CR: 定常領域プロンプ、Pcdha10:  $\alpha 10$ 特異的プロンプ

#### (6) DNA メチル化による遺伝子発現制御の解析

CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ が、個々の神経細胞で異なる発現をすることより、この遺伝子クラスターにおけるプロモーター領域のDNAメチル化パターンについて解析を行った。培養細胞株であるC1300とM3では発現している $\alpha$ アイソフォームが異なっており、発現が認められる $\alpha$ アイソフォームのプロモーター領域では脱メチル化状態が、一方発現していないプロモーター領域では高いメチル化状態であった。この培養細胞株を脱メチル化剤である5-azacytidineで処理したところ発現していなかった $\alpha$ アイソフォームの発現を誘導することができた。これらの結果は、 $\alpha$ アイソフォームの発現にプロモーター領域のDNAメチル化制御が関与する可能性を強く示唆するものである。また、小脳プルキンエ細胞における $\alpha$ アイソフォームのプロモーター領域の解析を行ったところ、種々の

DNAメチル化パターンが混在していた (Kawaguchi et al 2008)。これらの結果より、脳形成過程における個々の神経細胞でのDNAメチル化制御機構についての解析が必要となる。

#### (7) CNR/プロトカドヘリンファミリーのタンパク質構造決定

マウス CNR/プロトカドヘリン $\alpha 4$ タンパク質のEC1領域についてNMRスペクトロスコピー法によるタンパク質構造解析を行ない、世界に先駆けてCNR/プロトカドヘリンファミリーのタンパク質構造決定に成功した。この解析により、活性化インテグリンと相互作用するRGD配列、プロトカドヘリン分子群EC1領域で保存されているCXXXXXC配列が構造表面に位置する機能ドメインであることを明らかにした。更に古典的カドヘリンに存在するホモフィリック結合ポケット構造がCNR/プロトカドヘリン $\alpha 4$ タンパク質では認められないことを明らかにし、 $\alpha 4$ タンパク質のホモフィリックな結合活性が無いことを確認した (Morishita et al, 2006)。

#### (8) 結語

本研究により、多様化膜分子群であるCNR/プロトカドヘリン $\alpha$ が、ヒトを含む哺乳類の脳システムにおける神経細胞の多様化と神経回路形成に重要な分子であることが明らかになった。また、このCNR/プロトカドヘリンの遺伝子発現制御には、これまでに知られていない確率的な制御機構が関与していることが示唆された。やわらかい脳システムの形成に、遺伝的プログラムにより仕組みられた確率的な分子的基盤が示唆され、神経回路形成に必須であることが示唆されたことにより、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ のみならず $\beta$ や $\gamma$ の中樞神経系で発現する多様化膜分子群の解析が、これまでに無い新たな脳システムの形成と制御の概念をもたらすと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 55 件)

1. Noguchi, Y., Hirabayashi, T., Katori, S., Kawamura, Y., Sanbo, M., Hirabayashi, M., Kiyonari, H., Nakao, K., Uchimura, A. & Yagi, T. Total expression and dual gene-regulatory mechanisms maintained in deletions and duplications of the Pcdha cluster. *J. Biol. Chem.* **284**, 32002-14 (2009). 査読あり

2. Katori, S., Hamada, S., Noguchi, Y.,

Fukuda, E., Yamamoto, T., Yamamoto, H., Hasegawa, S. & Yagi, T. Protocadherin- $\alpha$  family is required for serotonergic projections to appropriately innervate target brain areas. *J. Neurosci.* **29**, 9137-47 (2009). 査読あり

3. Fukuda, E., Hamada, S., Hasegawa, S., Katori, S., Sanbo, M., Miyakawa, T., Yamamoto, T., Yamamoto, H., Hirabayashi, T. & Yagi, T. Down-regulation of protocadherin- $\alpha$  A isoforms in mice changes contextual fear conditioning and spatial working memory. *Eur. J. Neurosci.* **28**, 1362-76 (2008). 査読あり

4. Hasegawa, S., Hamada, S., Kumode, Y., Esumi, S., Katori, S., Fukuda, E., Uchiyama, Y., Hirabayashi, T., Mombaerts, P. & Yagi, T. The protocadherin- $\alpha$  family is involved in axonal coalescence of olfactory sensory neurons into glomeruli of the olfactory bulb in mouse. *Mol. Cell. Neurosci.* **38**, 66-79 (2008). 査読あり

5. Morishita, H. & Yagi, T. Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 584-92 (2007). 査読あり

6. Esumi, S., Kaneko, R., Kawamura, Y. & Yagi, T. Split single-cell RT-PCR analysis of Purkinje cells. *Nat. Protocols* **1**, 2143-51 (2006). 査読あり

7. Hirayama, T. & Yagi, T. The role and expression of the protocadherin- $\alpha$  clusters in the CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 336-42 (2006). 査読あり

8. Kaneko, R., Kato, H., Kawamura, Y., Esumi, S., Hirayama, T., Hirabayashi, T. & Yagi, T. Allelic gene regulation of Pcdh- $\alpha$  and Pcdh- $\gamma$  clusters involving both monoallelic and biallelic expression in single Purkinje cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 30551-60 (2006). 査読あり

9. 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**, 8368-74 (2005). 査読あり

10. 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 protocadherin- $\alpha$  gene cluster in single neurons. *Nat. Genet.* **37**, 171-6 (2005). 査読あり

[学会発表] (計 89 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: プロトカドヘリン  $\alpha$  を用いた精神神経疾患モデル動物およびその利用

発明者: 八木 健、濱田 俊、福田絵美

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2006-195401

出願年月日: 2006 年 6 月

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/yagi/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

八木 健 (YAGI TAKESHI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号: 10241241

### (2) 研究分担者

平林敬浩 (HIRABAYASHI TAKAHIRO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教

研究者番号: 40297015