

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 10 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2007～2012

課題番号：19100006

研究課題名（和文） 神経細胞多様化と神経回路組織化をもたらす分子メカニズムの解析

研究課題名（英文） Molecular mechanism for neuronal diversity and organization in the brain

研究代表者

八木 健 (YAGI TAKESHI)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：10241241

研究成果の概要（和文）：

本研究では脳の多様化分子群である CNR/プロトカドヘリン分子群に注目し、1) 個々の神経細胞の多様化をもたらす分子メカニズムの解析、2) 神経回路形成の分子メカニズムの解析より、神経細胞の多様性と神経回路形成を統合的に捉える分子メカニズムの解析を行った。その結果、CNR/プロトカドヘリンのランダムな発現制御に関わるシス因子、DNA メチル化、トランス因子の同定に成功した。また、CNR/プロトカドヘリン分子群が機能的な神経回路形成に必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

To examine molecular mechanism for generating neuronal diversity and for building neural network formation in the brain, we focused to diverse CNR/protocadherin molecules which express in the brain. In this study, we identified the several cis-elements, and revealed that DNA methylation and CTCF are essential to regulate expression of CNR/protocadherin genes in each neuron. And also we demonstrated that CNR/protocadherin- $\alpha$  molecules are essential to correct neural network formation in the brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	19,100,000 円	5,730,000 円	24,830,000 円
2008年度	17,600,000 円	5,280,000 円	22,880,000 円
2009年度	17,600,000 円	5,280,000 円	22,880,000 円
2010年度	16,700,000 円	5,010,000 円	21,710,000 円
2011年度	16,300,000 円	4,890,000 円	21,190,000 円
総計	87,300,000 円	26,190,000 円	113,490,000 円

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：カドヘリン、神経回路、遺伝子制御

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

脳は多様化した神経細胞より構成され、組織化された神経回路網を形成し、感覚、運動、感情、学習・記憶、意識などの秩序ある機能をもたらしている。この脳のシステムを理解してゆく為には、神経細胞の多様化と神経回路形成とを統合して捉える分子メカニズムを明かにする必要がある。Buck と Axel による多様化分子群—匂い受容体—の発見は、嗅神経細胞の多様化と神経回路形成のメカニズムを統合して理解することを可能とし、匂い情報処理システムを分子メカニズムとして捉える大きなブレイクスルーとなっている。この様に、多様化分子群を利用して多様化システムを捉える研究の方向性は、免疫系だけでなく脳神経系においても有効で意義のあるアプローチである。しかし、脳の高次なシステムを司る中枢神経系では、未だそのメカニズムは明かではなく今後の大きな研究テーマとなっている。私たちはこの様な観点より研究を推進し、中枢神経系の神経細胞で発現する多様化分子群—CNR/プロトカドヘリン分子群—を発見した。興味深いことにこの CNR/プロトカドヘリン分子群はゲノム染色体で遺伝子クラスター構造を形成していた。このゲノム構造は免疫グロブリンと類似したものであり、多様化したエクソンが縦列している可変領域と共通細胞内領域をコードする定常領域からなり、大きく3つの $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  遺伝子クラスターからなっていた。また、単一神経細胞での遺伝子発現解析により、CNR/プロトカドヘリンの可変領域エクソンは、個々の神経細胞で異なる組み合わせで発現し、 $\alpha$  タンパク質（14種）と $\gamma$  タンパク質（25種）の組み合わせにより約 $10^5$ もの異なった分子種となることが示唆されている。これらの結果は、CNR/プロトカドヘリン分子群が中枢神経系における神経細胞の多様化に関与することを強く示唆している。更に、この CNR/プロトカドヘリン分子群の遺伝子制御は、単一神経細胞において対立染色体ごとに独立した新しい制御機構であることも明かとなり、この遺伝子クラスターにおける遺伝子制御システムに神経細胞の多様化の分子的基盤があることが強く示唆されている。更に、最近の遺伝子欠損マウスの解析により、CNR/プロトカドヘリン分子群が神経細胞生存、シナプス形成、神経回路形成に関わっていることが明らかとなり、CNR/プロトカドヘリン分子群が中枢神経系を含む神経細胞の多様化と神経回路形成とのメカニズムに関わる興味深い多様化分子群であることが明かとなってきている。

## 2. 研究の目的

本研究では脳の多様化分子群である CNR/プロトカドヘリン分子群に注目し、1) 個々の神経細胞の多様化をもたらす分子メカニズムの解析、2) 神経回路形成の分子メカニズムの解析より、神経細胞の多様性と神経回路形成を統合的に捉える分子メカニズムを明らかにする。具体的には、CNR/プロトカドヘリン遺伝子クラスターにある可変領域エクソンが、神経細胞ごとに異なる発現制御を受けていることより、可変領域エクソンのプロモーター領域の共通配列 (CGCT) に注目し、DNA メチル化、結合する DNA 領域、結合タンパク質を明らかにする。また、遺伝子クラスターを変換したマウス、可変領域エクソン数変換、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  遺伝子クラスターの遺伝子欠損マウス、コンディショナル遺伝子欠損マウスを作製して、単一神経細胞における発現パターンの変化、神経細胞の多様化の異常を解析するとともに、神経回路形成異常、行動異常の解析を行い、神経細胞の多様化と機能的神経回路形成とを中枢神経全体を対象に統合的に解析する。特に、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ 分子群の関与が強く示唆されている嗅神経投射、セロトニン神経投射の制御については、嗅神経細胞やセロトニン神経細胞に特異的に遺伝子発現させる系を確立して、分子メカニズムの詳細を解析する。最終的には、遺伝子クラスターに階層的に関わる遺伝子制御機構を明らかにし、神経回路形成や脳機能との関連性にアプローチする。

## 3. 研究の方法

本研究では、脳の多様化分子群である CNR/プロトカドヘリン分子群に注目し、1) 個々の神経細胞で異なる発現様式を生み出す分子メカニズム、2) 神経回路を形成する分子メカニズムの研究を同時に推進する。この研究成果を統合することで、最終的には中枢神経系全般における神経細胞の多様化と機能的神経回路形成を捉える分子メカニズムを明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) CNR/プロトカドヘリン $\alpha$ のプロモーター領域の DNA メチル化による遺伝子発現制御の関与を特異的な $\alpha$ 分子種を発現している C1300 や M2 細胞株を用いて明らかにした。また、このプロモーター領域の DNA メチル化状態が *in vivo* の神経細胞ではモザイク状態であり、DNA 鎖ごとに異なるパターンである可能性が示唆された (Kawaguchi et al 2008)。

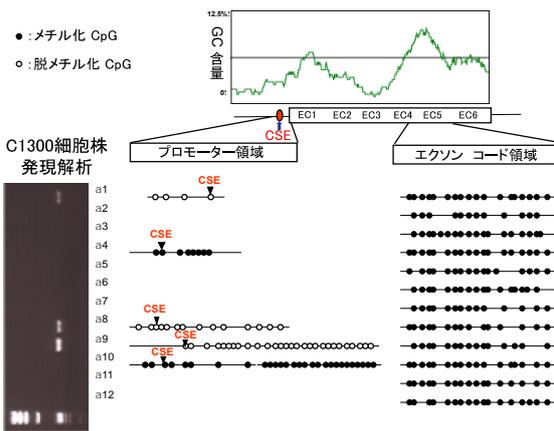


図1 C1300細胞株におけるCNR/プロトカドヘリンαの発現とDNAメチル化パターン。発現しているプロモーター領域では脱メチル化が認められている。CSE:プロモーターでの保存された共通配列。

ことが明らかとなった (Noguchi et al 2009)。脳において、個々の神経細胞でのランダムな遺伝子制御が示唆されたことは、神経回路をもたらす新たな遺伝的プログラムを示唆するものであった。

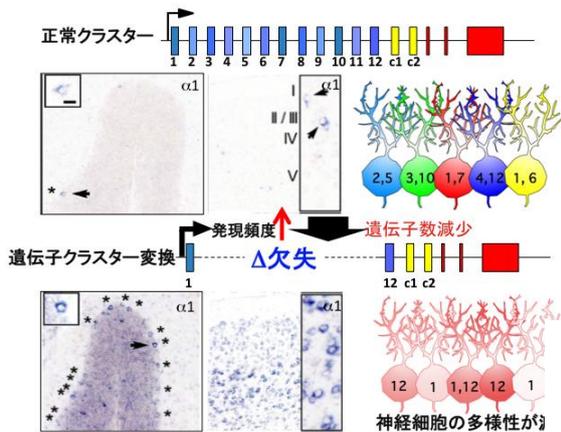


図2 CNR/プロトカドヘリン遺伝子クラスター変換マウスでの神経回路形成の解析。遺伝子数を減少させると、神経細胞における発現頻度が増加した。サイコロの目が選ばれる様率的な発現メカニズムが存在する。

(3) CNR/プロトカドヘリン遺伝子クラスターのα、γのみでなくβ遺伝子クラスターにおいても個々の神経細胞でのランダムな組み合わせの発現が認められ、α、β、γ遺伝子クラスターがそれぞれ独立した遺伝子制御機構を持っていることを明らかにし (Hirano et al 2012)。この結果により、神経細胞1個で15種類の分子種が発現しており、その内10種類がランダムな発現をしていることが明らかとなった。

欠損マウスでは、羊の全てのラン明らかとなり、1が分化した神経カドヘリン遺伝...とが明らかに員マウス的大脑れるバレル構...とが明らかとのランダムなこの関連性になっている

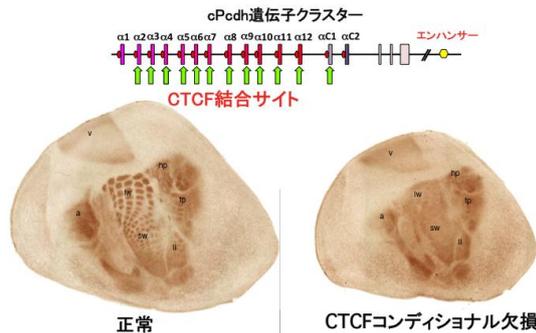


図3 CTCFによるcPodh制御と欠損異常。CTCFはCNR/プロトカドヘリン遺伝子クラスターに結合(図上)し、発現制御に関わることが明らかとなっている。興奮性神経細胞でCTCFを欠損させると体性感覚野のバレル形成が消失した(図下)。このCTCFの操作により神経細胞でのランダムな発現を制御することができる。

(5) CNR/プロトカドヘリンα遺伝子クラスターの下流にあるDNaseI感受性の高いHS5-1領域を欠損したマウスを作製することにより、この領域がα遺伝子クラスターの下流のエクソンのランダムな発現制御に関わっていることが明らかになった。しかし、上流のエクソンのランダムな発現制御に関わるシス領域については不明である。また、プロト

#### 神経細胞の個性化メカニズムの解析

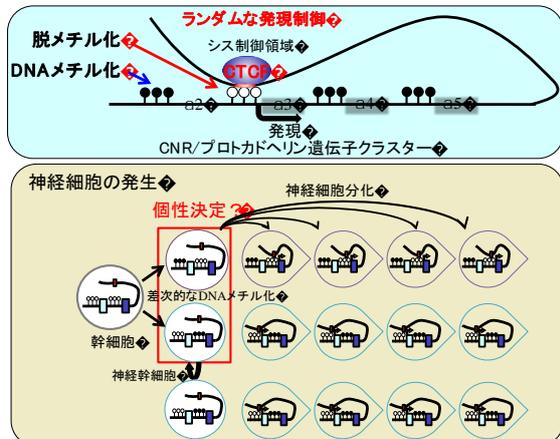


図4 CNR/プロトカドヘリン遺伝子の神経細胞での個性的発現の分子メカニズム。神経細胞の発生過程でのDNAメチル化、シス制御領域、トランス因子CTCFがこの発現制御に関わることが明らかとなった。

カドヘリン $\gamma$  遺伝子クラスターの下流にあるシス制御領域を DNaseI 感受性、トランスジェニックマウス作製により特定した。この領域を欠損させたマウスを作製したところ興味深いことに  $\beta$  遺伝子クラスター全体のランダムな発現制御が完全に消失した。この結果より、 $\beta$  遺伝子クラスターのランダムな発現制御に関わるシス制御領域の同定に成功した。また、このシス制御領域欠損マウスでは大脳皮質の体性感覚野であるバレル構造が乱れており、機能的な神経回路形成への関与も示唆された (Yokota et al 2011)。

(6) CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  定常領域欠損において、嗅神経軸索の嗅球系球体への異所的な投射異常が認められた。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 (Hasegawa et al 2008)。

更に、この嗅神経軸索投射には CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  タンパク質の細胞質領域が重要であること、 $\alpha$  分子群の多様性が必ずしも必要ないことが明らかとなった。また、 $\alpha$  分子群の軸索投射に関わる分子メカニズムが、これまでに知られている匂い受容体を介した神経活動や発生の位置情報とは独立したものであることも明らかになった (Hasegawa et al 2012)。

(7) CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  が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。CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  定常領域欠損では、通常の成体マウスで広範にほぼ均一に分布しているセロトニン神経軸索の分布が、セロトニン神経の最終標的領域である大脳皮質、海馬、視床、線条体、嗅球など多くの脳領域で認められた。これらの結果より、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  がセロ

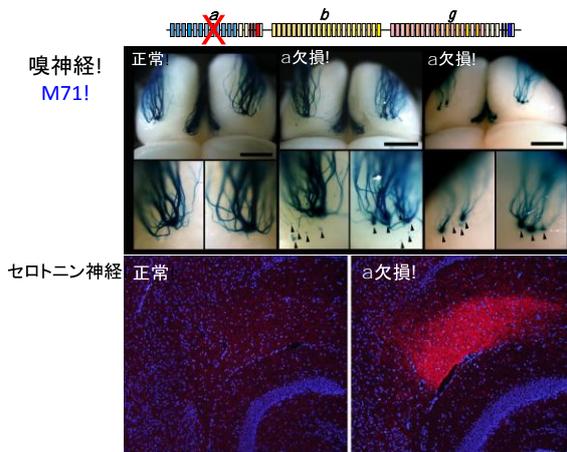


図5 CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  欠損マウスでの神経回路形成での異常。匂い受容体 M71 を発現している嗅神経軸索投射(青)が  $\alpha$  欠損マウスでは正確に収束していない(図上)。また、海馬に投射するセロトニン神経軸索(赤)が分散せず異常に収束している(図下)。

必須であることが明らかとなった (Katori et al 2009)。

(8) 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結果、運動、感覚、不安などでは大きな行動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。(Fukuda et al 2008)。これらの結果は、CNR/プロトカドヘリン $\alpha$  が哺乳動物の学習・記憶における行動制御に関わることを示唆する結果である。

(9) CNR/プロトカドヘリン分子群は、個々の神経細胞でランダムで異なる発現をしていること、ヘテロ 4 量体での特異的な細胞接着能があることから、神経細胞の個性が指数関数的状態であることを報告した (Yagi 2012)。この結果は、近年明らかになってきている神経細胞の結合がガウス分布でなく、long-tail 分布となっている結果を考える中で、生理学研究においても興味深い。

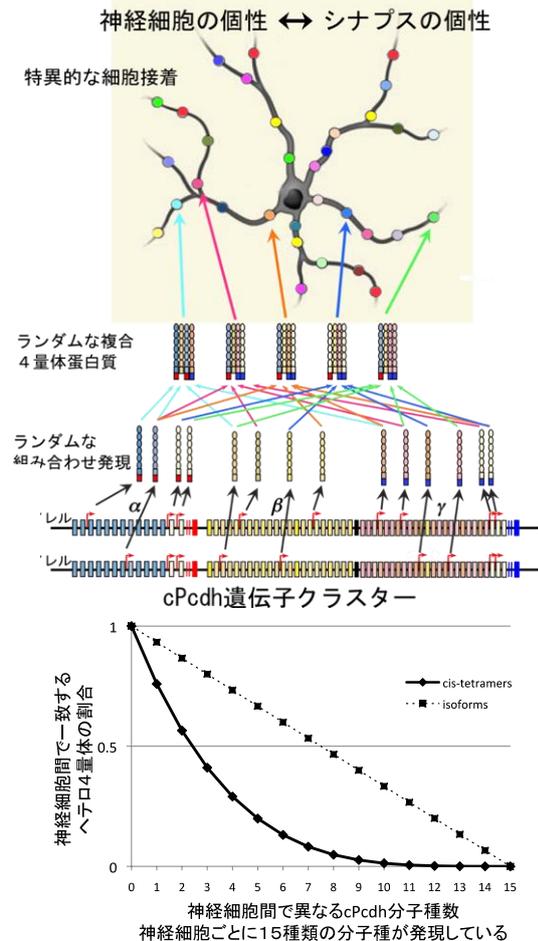


図6 CNR/プロトカドヘリン分子群の神経細胞での個性的発現。ヘテロ 4 量体により神経細胞における個性は指数関数的な関係となる。発現する分子種が 3 つ違うだけでヘテロ 4 量体は 43! しか一致しなくなる。

(10)まとめ：本研究の結果により、CNR/プロトカドヘリン分子群が脳神経系において、神経回路形成に必須な遺伝子であること、神経細胞ごとにランダムで異なる組み合わせ発現をしていることが明らかになった。このような分子的性質は他にないものであり、この分子群が神経細胞ごとの局所回路の形成に関与している可能性が強く示唆された。近年の生理学研究により、神経細胞ごとの活動性の振る舞い、細胞集団としての同期や協調が情報処理において重要であることが示唆されており、この基盤には局所回路形成メカニズムがあることが示唆されている。本研究成果は、この局所回路形成の分子的基盤となることが考えられ、今後の研究の進展により、脳の作動原理を解明する大きなブレイクスル

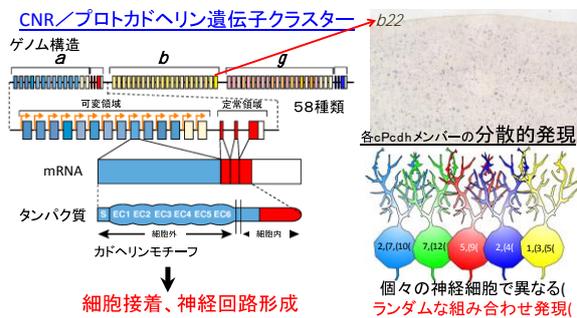


図7 CNR/プロトカドヘリン分子群は、遺伝子クラスターとなる多様化標的認識遺伝子としてコードされており、本研究により神経回路形成や神経細胞の個性化に関わることが明らかとなった。その結果、脳の作動原理となる局所回路形成への役割が強く示唆された。

一になることが期待される。

## 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 33 件)

1. Constitutively expressed Protocadherin- $\alpha$  regulates the coalescence and elimination of homotypic olfactory axons through its cytoplasmic region. Hasegawa S, Yagi T. (他 7 名、最終著者) *Front. Mol. Neurosci.* 5, 97, (2012) doi: 10.3389/fnmol.2012.00097 [査読有]

2. Single-neuron diversity generated by Protocadherin- $\beta$  cluster in mouse central and peripheral nervous systems. Hirano K, Yagi T. (他 5 名、最終著者) *Front. Mol. Neurosci.* 5, 90, (2012) PMID: 22969705 [査読有]

3. CTCF is required for neural development and stochastic expression of clustered Pcdh genes in neurons. Hirayama T, Yagi T.

(他 4 名、最終著者) *Cell Reports* 2, 345-357, (2012) doi: 10.1016/j.celrep.2012.06.014. [査読有] 表紙に抜粋

4. Molecular codes for neuronal individuality and cell assembly in the brain. Yagi T *Front. Mol. Neurosci.* 5, 45. (2012) PMID: 22518100 [査読有]

6. Restoration of contralateral representation in the mouse somatosensory cortex after crossing nerve transfer. Yamashita H, Yagi T (他 9 名、第 7 著者) *PLoS ONE* 7, e35676 (2012) PMID: 22536423 [査読有]

7. Identification of the cluster control region for the protocadherin-b genes located beyond the protocadherin-g cluster. Yokota S, Yagi T (他 7 名、最終著者) *J. Biol. Chem.* 284, 32002-32014, (2011) PMID: 21771796 [査読有]

8. A Novel Instrumented Multi-Peg Running Wheel System, Step-Wheel, for Monitoring and Controlling Complex Sequential Stepping in Mice. Kitsukawa T, Yagi T (他 8 名、第 7 著者) *J. Neurophysiol.* 106, 479-487, (2010) PMID: 21525375 [査読有]

9. Total expression and dual gene-regulatory mechanisms maintained in deletions and duplications of the Pcdha cluster. Noguchi Y, Yagi T (他 9 名、最終著者) *J. Biol. Chem.* 284, 32002-32014, (2009) PMID: 19797050 [査読有]

10. Protocadherin- $\alpha$  family is required for serotonergic projections to appropriately innervate target brain areas. Katori S, Yagi T (他 7 名、最終著者) *J. Neurosci.* 29, 9137-9147, (2009) PMID: 19625505 [査読有] 表紙に抜粋

11. DNA polymerase delta is required for early mammalian embryogenesis. Uchimura A, Yagi T (他 3 名、最終著者) *PLoS ONE* 4 (1), e4184, (2009) PMID: 19145245 [査読有]

12. Expression levels of Protocadherin- $\alpha$  transcripts are decreased by nonsense-mediated mRNA decay with frameshift mutations and by high DNA methylation in their promoter regions. Kaneko R, Yagi T (他 4 名、最終著者) *Gene* 430, 86-94, (2009) PMID: 19038318 [査読有]

13. Clustered protocadherin family. Yagi T, *Dev. Growth. Differ.* 50, S131-S140, PMID: 18430161 (2008) [査読有]

14. The protocadherin- $\alpha$  family is involved in axonal coalescence of olfactory sensory neurons into glomeruli of the olfactory bulb in mouse. Hasegawa S, Yagi T (他 9 名、最終著者) *Mol. Cell. Neurosci.* 38, 66-79, (2008) PMID: 18353676 [査読有] 表紙に抜粋

15. Down-regulation of protocadherin- $\alpha$  A isoforms in mice changes contextual fear conditioning and spatial working memory. Fukuda E, Yagi T (他 9 名、最終著者) *Eur. J. Neurosci.* 28, 1362-1376, (2008) PMID: 18973563 [査読有]

16. Relationship between DNA methylation states and transcription of individual isoforms encoded by the protocadherin- $\alpha$  gene cluster. Kawaguchi M, Yagi T (他 5 名、最終著者) *J. Biol. Chem.* 283, 12064-12075, (2008) PMID: 18204046 [査読有]

17. Protocadherin family: diversity, structure, and function. Morishita H & Yagi T, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 19, 584-592, (2007) PMID: 17936607 [査読有]

18. Interactions between Plexin-A2, Plexin-A4, and Semaphorin 6A Control Lamina-Restricted Projection of Hippocampal Mossy Fibers. Suto F, Yagi T (他 12 名、第 9 著者) *Neuron* 53, 535-547, (2007) PMID: 17296555 [査読有]

[学会発表] (計 91 件)

1. Neuronal diversity by clustered protocadherin genes. Yagi T, India-Japan Developmental Workshop, Bangalor India 2012 年 1 月 9 日 招聘講演

2. Genetic codes for generating the complex brain. Neuronal diversity by clustered protocadherin genes Yagi T, Tohoku University-Taiwan Neuroscience Workshop, Keynote Speech. Taipei Taiwan 2010 年 1 月 22 日 招聘講演

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: 特徴抽出装置、特徴抽出方法、及び、そのプログラム

発明者: 木津川尚史、八木 健

権利者: 大阪大学

種類: 特許権

番号: 特願 2010-234064

出願年月日: 2010 年 10 月 18 日

国内外の別: 国内

名称: 水溶性近赤外蛍光材料およびマルチモード水溶性近赤外蛍光材料

発明者: 神隆、吉岡芳親、駒井豊、大澤五住、

八木健、金子涼輔、精山明敏、関 淳二

権利者: 大阪大学

種類: 特許権

番号: 特願 2008-130884 号

出願年月日: 2008 年 5 月 19 日

国内外の別: 国内

名称: さえずり変異マウス

発明者: 八木 健、内村有邦、日高裕子、古澤 満

権利者: 大阪大学

種類: 特許権

番号: 特願 2008-052705

出願年月日: 2008 年 3 月 3 日

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・生命機能研究科・教授

研究者番号: 10241241