

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19710163
 研究課題名（和文）個々の神経細胞を特徴づける遺伝子発現調節機構の解析
 研究課題名（英文）Analysis of gene regulation for neuronal cell identity

研究代表者
 平山 晃斉（HIRAYAMA TERUYOSHI）
 大阪大学・大学院生命機能研究科・特任研究員
 研究者番号：40437398

研究成果の概要：

クラスター型プロトカドヘリン（*cPcdh*）ファミリーは、個々の神経細胞で異なる種類のアイソフォームを発現することから、複雑な神経回路形成に関与することが想定されている。本研究では *cPcdh* の遺伝子発現制御機構を明らかにする目的で、特に各 *cPcdh* の第一エクソン上流領域にある保存性の高いエレメント（CSE）に焦点を当て解析をおこなった。その結果、各 CSE が異なる転写活性を示し、異なる因子が結合することを示す結果を得た。本結果は、*cPcdh* の個々の神経細胞における差次的遺伝子発現に CSE の多様化が関与している可能性を強く示唆する。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

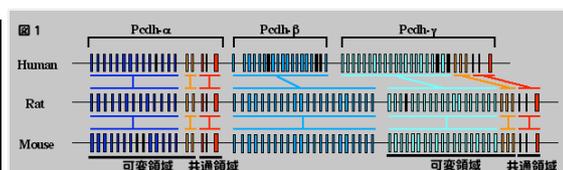
研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：クラスター型遺伝子

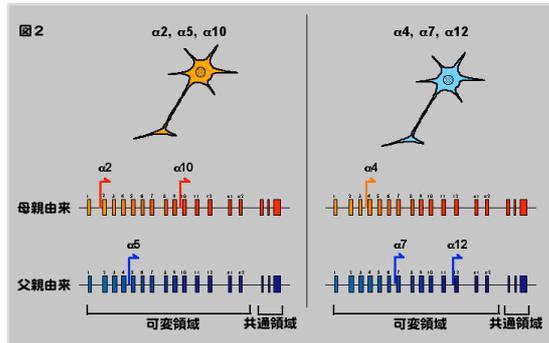
1. 研究開始当初の背景

クラスター型プロトカドヘリン（*cPcdh*）分子群は細胞接着分子カドヘリンスーパーファミリーに属する大きなサブファミリーで、中枢神経系で強い発現を示す。これまで脊椎動物でのみで確認されハエなど無脊椎動物にはない。*Pcdh*は α 、 β 、 γ の3つのクラスターからなり、 α と γ は主に細胞外領域をコードする可変領域エクソンと細胞内領域を



コードする3つの共通領域エクソンからなる（図1）。その特徴的な遺伝子構造から中枢神経系の多様化を担う分子として想定されている。これまでの研究結果と概略図（図2）を以下に示す。

(1) 一つ可変領域エクソンが3つの共通領域エクソンにスプライシングされることに



より転写される。

(2) 各可変領域エクソンの上流には保存性の高いエレメントCSEがあり、調べられた転写開始点は全てCSEの下流から始まっている。

(3) CSEの最も保存性の高い塩基配列に変異を入れると転写活性が低下する。

(4) 単一細胞における *cPcdh* 遺伝子の発現解析により、細胞ごとに異なる可変領域エクソンが異なる組み合わせで発現しており、且つ発現する遺伝子は父親由来と母親由来の染色体で異なる。

(5) α と γ は同一細胞で発現し、 α と γ は複合体を形成し得る。 α と γ の単純な組み合わせにより生じる多様性を計算すると109,200通りになる。

(6) *cPcdh*タンパク質は γ -セクレターゼにより細胞内ドメインが切断され、切断された断片は核内に運ばれ*cPcdh*遺伝子の転写を活性化させる。

2. 研究の目的

本研究では、中枢神経系に多様性をもたらす分子基盤の一つとして、個々の神経細胞で異なる組み合わせで発現する *cPcdh* に着目し、その発現調節機構を明らかにする。特に、各可変領域エクソン上流にある保存性の高いエレメントCSEに焦点を当て解析する。

予備的実験として *Pcdh- α 9* が発現している培養細胞を用いてCSEの転写活性を測定した結果、転写活性が認められた。一方、*Pcdh- α*

*9*のCSEを培養細胞では発現していない *Pcdh- α 11*のCSEに置換すると転写活性が著しく低下することがわかった。本結果は、各CSEが異なる活性をもつことを示唆する。塩基配列の解析から、各可変領域エクソン上流に位置する強く保存された配列はCSEのみで *Pcdh- α* では22bpであることが報告されている。各可変領域エクソン上流の配列をさらに詳細に調べ、各CSEの前後にはCSEほど高くはないが保存された配列があり、その保存領域はヒト、ラット、マウスで共通で44bpあることがわかった。保存領域が長いことから、各CSEは複数のエレメントかで構成されている可能性が考えられた。本研究では、CSEを含めた44bpの転写における役割を詳細に解析する。

3. 研究の方法

(1) 転写開始部位の解析

Pcdh- α の各アイソフォームの転写開始部位を明らかにするため、cDNAライブラリーからクローニングしてきた *Pcdh- α* の転写開始部位を解析した。また、mRNAのcap構造を利用した5'Race法でも確認した。

(2) CSEの転写活性の解析

各CSEの転写活性を測定するため、培養細胞を用いてルシフェラーゼアッセイをおこなった。実験には、神経芽細胞腫であるc1300細胞を用いた。c1300細胞は *Pcdh- α 9* が発現している。*Pcdh- α 9* 遺伝子上流のCSEを含む配列にルシフェラーゼをコードする遺伝子を繋いだベクターを作製し、CSEを欠損または変異させた様々なベクターと比較することで保存性の高い配列のうち重要な配列を同定した。この結果をもとに、*Pcdh- α 9*の転写活性に重要な配列をc1300細胞では発現していない他の *Pcdh- α* のCSEの相同領域と置換することでCSEの互換性の有無を検討し、CSE配列中の共通エレメントと特異的エレメントの解析をおこなった。

(3) ゲルシフトアッセイによりCSEに結合

するタンパク質との相互作用の解析をおこなった。ゲルシフトアッセイに用いたプローブは、(2)のルシフェラーゼアッセイで得られた結果をもとに作製した。解析にはc1300細胞から抽出した核タンパク質を用いた。

4. 研究成果

*Pcdh-α*の転写開始点は、*Pcdh-α2*を除いて全てCSEの下流から転写が開始されていた。一方、*Pcdh-α2*は5'Race法でも2カ所の転写開始点があることから、CSEとは別にプロモーターを持つことが示された。*Pcdh-α2*は、他のアイソフォームとは発現制御が異なり、一つの細胞で常に両側の染色体から発現していることが知られている。*Pcdh-α2*のCSEとは別のプロモーターがこの制御に関与している可能性が高い。

また、CSE欠損により遺伝子発現が著しく低下することから各アイソフォームの発現にCSEが重要な役割を担うことがルシフェラーゼアッセイにより確認できた。また、各アイソフォームのCSEが示す転写活性が異なること、互換性が無い事が明らかになった。CSEの前後には70%程度の相同性を示す領域があり、この領域も転写に寄与することが明らかになった。これらの結果から、各CSEは高い保存性を示しながらもそれぞれ異なる性質をもつことが示された。

次に、CSEに結合するタンパク質との相互作用をゲルシフトアッセイにより解析した結果、各CSEには異なるタンパク質が結合していることを示す結果を得た。また、各CSEプローブは互いに競合しないことから、各CSEに異なる因子が特異的に結合することが示唆された。

以上の結果から、CSEは*cPcdh*の発現に必須のエレメントであり、各CSEはアイソフォーム間で異なることが示された。多様化したCSEは、個々の神経細胞で差次的遺伝子発現を示

す*cPcdh*の発現制御の一端を担う可能性が高い。今後、CSEに結合する因子の解析を推進し、個々の神経細胞で差次的遺伝子発現を可能とする制御機構を明らかにする必要がある。

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2件)

(1) Kawaguchi M, Toyama T, Kaneko R, Hirayama T, Kawamura Y, Yagi T. Relationship between DNA methylation states and transcription of individual isoforms encoded by the protocadherin-alpha gene cluster. J Biol Chem. 2008 May 2;283(18):12064-75. 査読有.

(2) 平山晃斉、長谷川園子、八木健、「クラスター型プロトカドヘリンファミリー；多様性創出機構とその機能解明に向けて」蛋白質 核酸 酵素 53、358-364 (2008) 査読無し。

[学会発表] (計9件)

(1) 平山晃斉、正木利栄、横田慎一、佐々木綾子、八木健、個々の神経細胞で差次的発現を示すクラスター型プロトカドヘリン遺伝子の発現制御機構の解析、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (神戸) 2008年12月9日~12日

(2) Yokota S, Hirayama T, Hirabayashi T, Kawamura Y, Yagi T. Identification of an enhancer element for diverse protocadherin-gamma genes which make a gene cluster in genome and whose isoforms are expressed in individual neurons. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (神戸) 2008年12月9日~12日

(3) Yokota S, Hirayama T, Hirabayashi T, Kawamura Y, Yagi T. Identification of an enhancer element for diverse protocadherin-gamma genes which make a gene cluster in genome and whose isoforms are

expressed in individual neurons. Gordon Research Conference 2008. Neural Development.

(4)村上貴洋、横田慎一、金子涼輔、平山晃 斎、八木健、脳神経系で発現する多様化膜分子群 CNR/Pcdh α のエンハンサーHS5-1 の解析、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜) 2007年12月11日～15日

(5)河村佳見、南ひかる、金子涼輔、平山晃 斎、八木健、プロトカドヘリン- α クラスタールにおける α C2 の発現機構と分子機能の解析、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜) 2007年12月11日～15日

(6)川口将史、遠山知子、金子涼輔、平山晃 斎、河村佳見、八木健
プロトカドヘリン- α クラスタールにおける差次的発現パターンを制御するメカニズムの解析、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜) 2007年12月11日～15日

(7)平山晃 斎、正木利栄、横田慎一、佐々木綾子、八木健、クラスター型プロトカドヘリン遺伝子の発現制御機構の解析、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜) 2007年12月11日～15日

(8)横田慎一、平山晃 斎、八木健、プロトカドヘリン γ クラスタールにおけるエンハンサー領域の同定、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜) 2007年12月11日～15日

(9)野口由紀子、河村佳見、平林敬浩、内村有邦、川口将史、香取将太、平山晃 斎、八木健、プロトカドヘリン α 遺伝子クラス

ターのゲノム構造改変による発現パターン解析、Neuro 2007 第30回 日本神経科学大会 (横浜) 2007年9月10～12日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 晃斎 (HIRAYAMA TERUYOSHI)
大阪大学・大学院生命機能研究科・特任研究員
研究者番号：40437398

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し