

平成23年5月1日現在

機関番号：13101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20570187
 研究課題名（和文）神経プロトカドヘリンとダウン症CAM（DsCAM）のリガンド結合と分子機能解析
 研究課題名（英文）The Interactive Mechanisms of neural cell adhesion molecules :Protocadherin and IgCAM.
 研究代表者
 武内 恒成（TAKEUCHI KOSEI）
 新潟大学・医歯学系・准教授
 研究者番号：90206946

研究成果の概要（和文）：

神経細胞接着分子である免疫グロブリンスーパーファミリー（IgCAM）分子群とプロトカドヘリン分子群は数多くの分子種を有し、神経回路形成において重要な役割を果たす。これら分子は基本ホモフィリックな結合をするのみならず、多くのヘテロフィリックな結合様式を示す。我々はバキュロウイルスによる昆虫細胞膜への発現系を駆使することでそのヘテロフィリックな認識機構の原理を解析した。残念ながら統一的な制御メカニズムは見いだせなかったが、多くのこれら分子群は細胞外マトリックス、とくにプロテオグリカンで制御されることを見出した。さらに硫酸基転移酵素のKOマウスを作成することでこれら分子群の発現部位が変わること、コンドロイチン硫酸基による微妙な制御システムを解析することを可能にした。

研究成果の概要（英文）：

Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules (IgCAM) and Proto-cadherin family members (Pcdh) play important roles in the neural network formations. These member proteins have the interaction systems of hemophilic binding and heterophilic bindings to not only various cell adhesion proteins but also many extra cellular proteins (ECMs). IgCAMs and Pcdh were regulated by the expression of chondroitin sulfate proteoglycans especially. We generated the knockout mice of the enzymes involved in the synthesizing of chondroitin sulfate. The expression pattern of IgCAMs and Pcdh were perturbed in the developmental stages of brain formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：細胞生物学、神経科学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：脳・神経、神経回路、細胞接着

1. 研究開始当初の背景
 プロトカドヘリンファミリー（以下 Pcdh）および免疫グロブリンスーパーファミリー（以下 IgSF）分子群は、高次神経系を中心

に発現し、脳・神経回路機能形成に関わる細胞接着分子群である。これらの分子機能の詳細は他の認識・接着分子と比べ、多くが不明である。クラシックカドヘリンは、強固な

ホモフィリック結合活性を持ち、生理機能もかなり明らかにされてきた。ところが、PcdhやIgSFでは様々なバリエーション分子があり、結合活性が低く、いずれも様々な他分子や細胞外マトリックス分子に対してヘテロな結合活性も持つうえ、リガンド等の全容が掴めていない。さらにノックアウトマウスによる解析などからも神経回路形成などでは微妙な生理機能を示すのみのため解析が難しい。また、クラスター型Pcdhの生理機能に関しては、依然全く混沌としている。国内外を問わず、これら神経系での発現分布やKOマウスの解析はあるが、タンパク質間相互作用機構やリガンド解析、さらにその細胞機能は他の膜分子と比べて圧倒的に立ち遅れている。我々はマウスから進めてさらに、利用・解析しやすいモデル動物を駆使して神経系IgSFとプロトカドヘリンの解析を進めてきた。線虫IgSFのL1の機能解析(EMBO.J(2005))、最も原始的な脳を持つプラナリアのIgSFの網羅解析(Genes Cells(2006))、プラナリアでのPcdh群の発見と解析を行ってきた。また、IgSFのうち特にDsCAM(Down Syndrome CAM)の細胞内制御系の解析とその機能解析を行った。

その解析において我々は、これら接着分子やcoroninなど数多くカイコバキュロウイルスタンパク質発現系で大量発現し、分子間結合活性を含めた細胞生物学的な機能解析も進め(J.Cell Biol(2006)、Genes to Cells(2006)、EMBO.J(2005))、関連分子の構造解析も共同で進めている。従来、細胞膜タンパク質の発現系には困難が伴いボトルネックとなっていたが、カイコバキュロ発現系は、従来の発現系と比べて発現効率・“正確な”翻訳後修飾とトポロジーでの発現から、非常に強力な系であるとされる。我々もこの発現系を導入し、かつ、この応用も図ってきた。

2. 研究の目的

細胞生物学的解析において、IgSFの接着活性をカイコバキュロ系発現細胞の凝集活性から解析する系を我々は構築して用いてきた。この系では、カイコBmN4細胞の膜上に活性を持った膜蛋白質を大量に発現でき、ウイルス量調整で発現量も調節可能である。高い膜発現量から、弱い接着でも凝集体形成能を示し分子の微妙な接着活性の比較や、ホモ・ヘテロ結合の様式も解析できることを始めて示した。本研究では、これら上記の解析系を駆使して、Pcdh群間およびIgSFのうちDscamを始めとする分子間相互の結合活性と結合ドメインを網羅的に解析するとともに、バキュロ発現システムを生かしこれらPcdh、Dscamに結合する新規リガンド

分子の検索とヘテロフィリックな結合様式の統一的なメカニズムを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

これまでマウスIgSF(L1, NCAM, TAG-1など)、線虫L1、プラナリアNCAM, TAG-1, Dscamのカイコバキュロ細胞での全長発現を行い報告してきた。本申請課題のPcdh数種とマウスDscamの全長発現も進めて、細胞膜上への局在を確認する。PcdhファミリーではマウスPcdh1, Pcdh15に加え、さらにCNRとして知られるクラスター型PcdhのうちPcdh α 1, Pcdh α 5およびPcdh γ 、プラナリアDjPcdh1(マウスPcdh1オルソログ)、DjPcdh2を特に中心に選択し、これらの全長発現と解析に注力する。IgSFではIgドメインの各種欠失体の発現もこのシステムでは容易であるので、結合を見る際のコントロールとして作成する。Pcdhと、IgCAMにおいてはDscamの他にこれまでに発現した分子を利用して、新規リガンド分子の検索を行う。様々な既知の分子の他に、組織化学的に可能性のある分子、とくに細胞外マトリックス分子や糖鎖結合型の細胞膜分子の発現は他のタンパク質発現系では困難であるが、バキュロ発現系においては可能性が高いので、これら発現困難分子の解析も進める。

4. 研究成果

免疫グロブリンスーパーファミリー(以下IgSF)およびプロトカドヘリン(以下Pcdh)分子群は、高次神経系を中心に発現し、脳・神経回路形成関わる細胞接着分子群である。しかし、これらIgSFとPcdhはさまざまなバリエーション分子の存在と、結合活性はClassic型のカドヘリンより低く、さまざまな他分子とのリガンド結合特性を備え、脳発生過程・回路網形成において微妙な生理機能を示し解析が難しい。従来、これら分子を含む細胞膜タンパク質の発現系はネックとなっていたが、カイコバキュロ発現系においては発現効率の高さおよび正確な翻訳後修飾・正しいトポロジー発現から非常に有効であることを示すことができた。これまでに、マウスPcdh1, Pcdh15に加え、CNRとされるクラスター型PcdhのPcdh α 1, Pcdh α 5, Pcdh γ 、原始的PcdhとしてプラナリアDjPcdh1, DjPcdh2の全長発現を完了した。カイコ細胞膜表面にバキュロ発現系を用いて発現し、この細胞の凝集活性からの結合活性解析を進めた。これまでに多くの分子はホモフィリックな結合活性を備えていること、マウスPcdhは原始的なプラナリアDjPcd

と比較しても非常に微妙なホモフィリック結合活性を持つこと、さらにヘテロなPcdh相互での結合も進化とともに活性が見られることが明らかとなった。これは膜大量発現と細胞の扱いの容易い昆虫細胞を用いたことによる成果である。さらに各カドヘリンリピートを欠損あるいは置き換えた分子を発現しPcdhの機能ドメインをいくつか明らかにした。顕微鏡下において発現した機能ドメインを蛍光標識し、膜発現分子との結合を捉えることで確認をするシステムも確立することに成功した。IgSFにおいてはDsCAM分子の発現からマウス、プラナリアともにホモフィリック結合活性があり、とくに原始的なプラナリアDsCAMのほうが結合活性は高かった。さらにプラナリアには哺乳類にみられるようなスプライシングバリエーションがないことは確かで、ドメイン構成も哺乳類のタイプ配列をそのまま維持していることを、Pcdhと同様のIgドメインキメラ分子発現での結合活性から明らかとした。Pcdh・DsCAMともにゲノムインフォマティクスによる進化解析を北大工学部生命情報との共同で展開し、この進化的側面とインフォ情報を踏まえたさらに詳細な機能ドメイン解析を進められるようになった。さらに、多くのIgSFは細胞外基質コンドロイチン硫酸プロテオグリカンなどがリガンド調節機能を果たしていることが知られている。免疫組織化学的な解析からも多くのIgCAMだけでなく、Pcdhも種々のプロテオグリカンと局在性の一致や発現のタイミングの一致など相関性を認めたので、フォスファカン、ニューロカンを始めとする神経系プロテオグリカンの発現もバキュロシステムで進めた。これら発現分子および入手可能なさまざまなプロテオグリカンやその糖鎖類を検討した。これらプロテオグリカンは幾つかのものはIgCAMに直接結合するものを見出した。特にDsCAMに結合性を示すものもあった。Pcdhについてはこれらプロテオグリカンが直接結合することは無かったが、ホモフィリックな結合やヘテロ結合に対して阻害的あるいは促進的に機能することが示された。とくに、ヘパラン硫酸系は機能しないが、コンドロイチン硫酸系は促進あるいは阻害的に多くの分子に機能した。そこで、コンドロイチン硫酸基の転移酵素CsGalNacT-1&T-2のノックアウトマウスの作出および解析を開始した。これら酵素の欠損によって大脳皮質の肥厚が停滞すること、さらには骨形成にも胎生期に異常が見られることを見出した。大脳においてはおもに視床一皮質回路の異常がE16以降にみられ、この領域でのIgSFの発現にも異常をきたしている

ことを見出した。とくに、大脳の神経投射経路形成過程においては、様々なIgCAM陽性繊維路での形成の以上を認めた。また、Pcdhにおいては、その発現タイミングのずれがKOMAウスにおいて生じることを認めた。

CsGalNacT-1&T-2のヘテロ・ホモ・ダブルノックアウトマウスでそれぞれコンドロイチン硫酸基の減少程度が段階的であること、神経初期発生の解析時期では致死ではなく組織化学的・初代培養レベルでの解析が可能である。IgSFとPcdhなどの神経接着分子と細胞外基質リガンド機能を研究するには非常に強力な解析手段となることを示すことができた。

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5件)

- 1) Lu J, Nozumi M, Takeuchi K, Abe H, Igarashi M: Expression and function of neuronal growth-associated proteins (nGAPs) in PC12 cells. *Neurosci Res.* 70: 85-90 (2011) 査読有
- 2) Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S: Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* 585: 606-612 (2011) 査読有
- 3) Takeuchi K, Watanabe Y, Higa-Onaga S., Sato M., Tsujita M., Abe M., Natsume R., Li M., Furuichi T., Saeki M., Izumikawa T., Hasegawa A., Yokoyama M., Ikegawa S., Sakimura K., Amizuka N., Kitagawa H and Igarashi M.: Chondroitinsulfate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 is required for normal cartilage development. *Biochem. J.* *Biochem. J.* 432: 47-55 (2010) 査読有
- 4) Nozumi M., Togano T., Takahashi-Niki K., Lu J., Honda A., Taoka M., Shinkawa T., Koga H., Takeuchi K., Isobe T. and Igarashi M. Identification of functional marker proteins in the mammalian growth cone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 17211-17216 (2009) 査読有
- 5) Horiuchi M., Takeuchi K., Noda N., Muroya N., Suzuki T., Nakamura T., Kawamura-Tsuzuku J., Takahashi K., Yamamoto T. and Inagaki F. Structural basis for antiproliferative activity of Tob-hCaf1 complex. *J. Biol.*

Chem. 284 : 13244-13255 (2009) 査読有

[学会発表] (計6件)

1) プラナリアから探る神経系の進化: 免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF) とカドヘリンスーパーファミリー (CdhSF) 接着分子群の多様性、 峯田克彦、阿形清和、五十嵐道弘、武内恒成

第11回日本進化学会大会 2009/9/2 札幌

2) 遺伝子導入からみた遺伝子発現と遺伝子発現抑制系、 武内恒成、五十嵐道弘

第82回日本生化学会大会シンポジウム 2009/10 神戸

3) 新規バキュロウイルス発現細胞と膜タンパク質応用解析技術 武内恒成、五十嵐道弘
新技術説明会 2010/7/30 東京

4) コンドロイチン硫酸合成酵素欠損マウスにおける脳発達異常

比嘉進、武内恒成、小牟田縁、北川裕之、五十嵐道弘、 第33回日本神経科学大会、日本神経化学会合同大会 2010/12 横浜

5) Brain development abnormality in the mice lacking in the enzymes synthesizing chondroitin sulfate Susumu Higa Onaga, Yumi Watanabe, Kosei Takeuchi and Michihiro Igarashi, SFN 2010 2010/Sep. 3 Washington, USA

6) Functional analyses of mice lacking an enzyme for chondroitin sulfate synthesis Kosei Takeuchi, Susumu Higa-Onaga, Hitoshi Kawano, Michihiro Igarashi

7th Forum of European Neurosciences. 2010/July Amsterdam, Netherland

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 無血清培養できるカイコ培養細胞株の作出およびその利用

発明者: 今西重雄・吉田芳哉・武内恒成

権利者: 今西重雄・吉田芳哉・武内恒成

種類:

番号: 特願 2009-200187

出願年月日: 2009年8月31日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武内 恒成 (Takeuchi Kosei)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 90206946

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし