

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500447

研究課題名(和文) 神経回路形成における多様化膜分子群クラスター型プロトカドヘリンの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of clustered protocadherin during neural circuit formation

研究代表者

平林 敬浩 (Hirabayashi, Takahiro)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：40297015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：多様化膜分子群クラスター型プロトカドヘリン(cPcdh)はこれまでの結果から、神経回路形成に関与していることが示唆されている。本研究では、そのcPcdhの分子的多様性、細胞接着活性がシナプス形成時の細胞選別や機能的回路形成にどのように関与しているかを明らかにすることを目的とし、cPcdh分子の細胞接着活性解析および、Cre発現依存的にcPcdh遺伝子を欠損するcPcdh遺伝子コンディショナルノックアウトマウスの作製、解析を行った。その結果、Pcdhの一部の分子種、Pcdh分子群に細胞接着活性が認められた。また、終脳特異的にcPcdh遺伝子を欠損したマウスでは脳構造に異常が観察された。

研究成果の概要(英文)：The clustered protocadherin (cPcdh) genes encode diverse transmembrane proteins, which divide into three Pcdh-a, -b and -g clusters. Distinct sets of Pcdh genes are differentially expressed in individual neurons. The diversity of the cPcdh genes may contribute to selective interactions between neurons and be required for neural circuit formation.

In this study, to elucidate the physiological significance of cPcdh diversity, we analyzed adhesive property of cPcdhs by cell aggregation assay, and produced mice with a conditional knockout of cPcdh gene in telencephalon. Cell aggregation assay using K562 cells, which express cPcdhs revealed that Pcdh-alpha and Pcdh-beta have homophilic adhesive activity. The cPcdh conditional knockout mice were viable, but display abnormalities in the structure of the cerebral cortex. The detailed phenotypic analysis of these mutant mice are in progress.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：プロトカドヘリン 神経回路形成 接着分子 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

脳神経系は多様化した神経細胞種からなり、それらが多数のシナプス結合でつながり合うことで神経回路が形成されている。また、個々の神経細胞が他の莫大な数の神経細胞の中から適切な相手を選別し、シナプス結合を形成するには、多様化した細胞膜分子群による選択機構の存在が想定される。

クラスター型プロトカドヘリン (cPcdh) は多様化した膜分子群であり、ゲノム上の比較的狭い領域に特殊なクラスター構造をもつプロトカドヘリン分子種である。この遺伝子クラスターは、 \sim 遺伝子クラスターから構成され、それぞれプロトカドヘリン (Pcdh)、Pcdh、Pcdh 分子群を発現する。各 Pcdh、Pddh 分子種はひとつの各分子種ごとに異なる多様化した可変領域エクソンと3つのエクソン共通領域エクソンがスプライシングされ発現している。一方、Pcdh 遺伝子クラスターはイントロンを持たない1つのエクソンから構成され、その遺伝子が縦列している。マウスではこれまでに Pcdh が 14 分子種 (1- 12, c1, c2)、Pcdh (1- 22)、Pcdh (A1- A12, B1- B8, C3- C5) が共に 22 分子種存在することが知られており、いずれも細胞外領域には6つのカドヘリンモチーフを有する一回膜貫通型タンパク質である。また、どの分子種も中枢神経系で強く発現が認められ特に発達中の軸索やシナプス膜画分に多く存在している。脳における cPcdh 遺伝子の発現様式を単一神経細胞に対する RT-PCR および各分子種特異的プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションで解析した結果、一つの神経細胞では Pcdh、Pcdh、Pcdh いずれも複数の分子種を発現しており、その組み合わせは個々の細胞ごとに異なっていた (Esumi et al, Nature Genet, 2005, Kaneko et al, JBC, 2006)。

このことから、cPcdh 分子の組み合わせ発現は神経細胞に莫大な多様性を付与していると考えられる。

また、N-カドヘリンなどの古典的カドヘリンは細胞膜で cis-ホモダイマーを形成し、さらにそれらが細胞間の接着に関わっていることが知られているが、クラスター型プロトカドヘリンは Pcdh、Pcdh、Pcdh が細胞膜上で複合体を形成しており (Han et al, Mol Cell Proteomics, 2010)、さらに Pcdh には分子ごとにホモフィリックな細胞接着活性があることが明らかになっている (Shkreiner et al, PNAS, 2010)。以前、PCDH

全分子種を発現しない Pcdh 遺伝子ノックアウトマウスを作製し、解剖学的な解析を行ったところセロトニン神経の投射、嗅神経細胞の系球体への収束など神経回路形成に異常が観察された (Hasegawa et al, Mol Cell Neurosci, 2008, Katori et al, J Neurosci, 2009)。また、Pcdh の全分子種を欠損したマウスでは生後まもなく死亡す

るが、胎生期の個体を解析してみるとシナプスマーカー陽性細胞の減少が顕著に観察された (Wang et al, Neuron, 2002)。

以上の結果は、クラスター型プロトカドヘリンはシナプス形成に関与し、その分子的多様性がシナプス形成時において適切な他の細胞の選択に関与していることを強く示唆している。

2. 研究の目的

中枢神経系で発現している多様化膜分子群 cPcdh は個々の神経細胞で差次的発現し、それらのうち Pcdh の各分子は分子種特異的な細胞接着活性を有すること、さらに遺伝子ノックアウトマウスの表現型から神経回路形成に関与していることが示唆されている。本研究では、その cPcdh の分子的多様性、分子種特異的な細胞接着活性がシナプス形成時の機能的回路形成にどのように関与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) cPcdh 分子の接着活性解析

各 cPcdh 分子種発現ベクターを白血病細胞株 K562 細胞に導入し、その凝集を指標に cPcdh 分子種の接着活性を解析した。

(2) cPcdh 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスの作製

全ての cPcdh 遺伝子を欠損した cPcdh ノックアウトマウスは生後まもなく死亡するために生体における cPcdh 遺伝子の機能解析は困難であった。そこで cPcdh 遺伝子クラスターの最上流および最下流に loxP 配列を挿入し、Cre 発現依存的に cPcdh 遺伝子が欠損する cPcdh 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスを作製した。

4. 研究成果

(1) cPcdh 分子の接着活性解析

これまでに Pcdh 分子群はホモフィリックな細胞接着活性を有することが知られていたが、Pcdh、Pcdh の各分子群については明らかになっていなかった。本研究ではこれらについて細胞接着活性を解析したところ、Pcdh の一部の分子種、Pcdh 分子群に細胞接着活性が認められた。この結果は cPcdh がその組み合わせにより遺伝子にコードされた以上の莫大な種類の細胞接着活性を有するタンパク質複合体を生み出している可能性を示唆している。

(2) cPcdh 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスの作製

cPcdh 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスと終脳特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスを交配し、同領域で cPcdh 遺伝子を欠損するマウスを得た。その結果、大脳皮質において構造異常が観察された。現在、このマウスの表現型について詳細

な解析を進めている。

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3件)

1) Toyoda S, Kawaguchi M, Kobayashi T, Tarusawa E, Toyama T, Okano M, Oda M, Nakauchi H, Yoshimura Y, Sanbo M, Hirabayashi M, Hirayama T, Hirabayashi T, Yagi T.

Developmental epigenetic modification regulates stochastic expression of clustered Protocadherin genes, generating single neuron diversity.

Neuron 82, 2014, 94-108

DOI: 10.1016/j.neuron.2014.02.005.

査読有

2) Hasegawa S, Hirabayashi T, Kondo T, Inoue K, Esumi S, Okayama A, Hamada S, Yagi T.

Constitutively expressed Protocadherin- β regulates the coalescence and elimination of homotypic olfactory axons through its cytoplasmic region.

Front Mol Neurosci. 5, 2012, 97

DOI: 10.3389/fnmol.2012.00097

査読有

3) Yokota S, Hirayama T, Hirano K, Kaneko R, Toyoda S, Kawamura Y, Hirabayashi M, Hirabayashi T, Yagi T.

Identification of the cluster control region for the Protocadherin-beta genes located beyond the Protocadherin-gamma cluster.

J. Biol. Chem., 286, 2011, 31885-31895

DOI: 10.1074/jbc.M111.245605

査読有

〔学会発表〕(計15件)

1) 松下健一郎、クラスター型プロトカドヘリンの分子種特異的な細胞接着活性の解析、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月4日、神戸国際会議場

2) 豊田峻輔、Dnmt3b依存的なDNAメチル化は単一神経細胞におけるクラスター型プロトカドヘリン遺伝子群の確率的発現と樹状突起の自己忌避を制御する、第36回日本神経科学学会、2013年6月21日、京都国際会議場

3) 長谷川園子、多様化分子群クラスター型プロトカドヘリン欠損マウスの機能解析、第36回日本神経科学学会、2013年6月21日、京都国際会議場

4) 豊田峻輔、クラスター構造依存的なプロモーターDNAメチル化はプロトカドヘリン遺伝子クラスター内のアイソフォーム発現の分配を制御する、第35回日本神経科学大会、2012年9月21日、名古屋国際会議場

5) 目黒玲子、プロトカドヘリン 欠損マウスにおける外側膝状体背側核の網膜由来神経終末の形態異常、第35回日本神経科学大会、2012年9月21日、名古屋国際会議場

6) 平山晃斉、Gene regulation of the cluster Protocadherin and its disruption、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月14日

7) 金子涼輔、Gene regulatory changes in Protocadherin-cluster by gene duplication、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月15日

8) 八木 健、Loss of function analysis in mice for all protocadherin clusters、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月13日

9) 豊田峻輔、Promoter DNA methylation is dependent on gene cluster structure and regulates allocation of isoforms expression in each Protocadherin cluster、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月15日

10) 井之上幸範、Loss of function analysis in mice for all protocadherin clusters、Society for Neuroscience, Annual Meeting 2011、2011年11月11日、Washington, D.C.(USA)

11) 豊田峻輔、Promoter DNA methylation before the onset of neurogenesis is dependent on cluster structure, and regulates allocation of isoforms gene expression in each Protocadherin cluster、Society for Neuroscience, Annual Meeting 2011、2011年11月12日、Washington, D.C.(USA)

12) 豊田峻輔、Promoter DNA methylation before the onset of neurogenesis is dependent on cluster structure, and regulates allocation of isoforms gene expression in each Protocadherin cluster、SiNAPSA Neuroscience Conference '11、2011年9月22日、Ljubljana (Slovenia)

13) 堀尾修平、視床下部室傍核に存在するヒスタミン H1 受容体発現ニューロンの選択的破壊を利用した摂食調節機能の研究、第34回日本神経科学大会、2011年9月16日、パ

シフィコ横浜

14) 八木 健、全てのクラスター型プロトカドヘリンを欠損させたマウスの作製と解析、第34回日本神経科学大会、2011年9月16日、パシフィコ横浜

15) 金子涼輔、プロトカドヘリン - クラスターにおける重複遺伝子の差次的発現、第34回日本神経科学大会、2011年9月16日、パシフィコ横浜

〔図書〕(計1件)

Hirabayashi T, Yagi T. Springer Science + Business Media, Protocadherins in Neurological Diseases, "Cell Adhesion Molecules: Implications in Neurological Diseases", Advances in Neurobiology 8, 2014, 293-314,

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平林 敬浩 (HIRABAYASHI TAKAHIRO)
大阪大学・生命機能研究科・助教
研究者番号：40927015

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者