

平成21年 5月 7日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770147

研究課題名（和文） 神経細胞の多様化に関わる転写制御シスエレメントの同定

研究課題名（英文） Identification of regulatory cis-element for diversity of neurons

研究代表者

金子 涼輔 (KANEKO RYOSUKE)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40390695

研究成果の概要：

神経細胞の多様化に関わる膜分子群クラスター型プロトカドヘリン(*Pcdh*)の転写制御シスエレメントの同定と機能解析を行なった。進化的保存非コード領域を多数見だし、そのうちSR領域およびHS5-1領域それぞれの欠損マウスを作製・解析した。その結果、*Pcdh*の発現制御においてSR領域単独での欠損の影響はほとんどないことが明らかとなった。以上により、神経細胞の多様化メカニズムの複雑性の一端を示すことができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：神経細胞、神経発生、脳形成、多様性、転写制御、単一細胞発現解析

## 1. 研究開始当初の背景

## 国内・国外の研究動向

脳において神経細胞は高度に多様化している。しかしながら、その多様性がどのようにして作られるかは未知の部分が多い。本研究で注目するクラスター型プロトカドヘリン(*Pcdh*)は脳神経系で発現する多様化した膜分子群でありカドヘリンスーパーファミリーに属している。*Pcdh*は-・、-・、-・のサブファミリー

に分類され、哺乳類では約60種類の互いに異なった*Pcdh*が同一染色体上にクラスターを作っている(Khomura *et al*, *Neuron*, 1998, Wu *et al*, *Cell*, 1999)。これまでに*in situ*ハイブリダイゼーションによる解析から、*Pcdh*は個々の細胞ごとに異なった組み合わせで発現していることが示されていたが、その詳細は不明であった。

## これまでの研究成果

研究代表者らは個々の細胞ごとの*Pcdh*発現様式を詳細に解析する中で、単一プルキンエ細胞を用いた分注RT-PCR法の開発・改良を行い(Esumi, [Kaneko et al, Nature Protocols, 2006](#))、それを用いて*Pcdh*-および-の遺伝子発現制御を調べた。その結果、小脳プルキンエ細胞において*Pcdh*-および-のC型サブグループは全てのプルキンエ細胞で両対立染色体から発現していた。しかしながら、その一方、他の*Pcdh*は12の*Pcdh*-中から2種類のみ、22の*Pcdh*-中から3種類のみが細胞ごとに異なった組み合わせで選択的に発現していた。さらに驚くべきことに、対立染色体ごとの発現を調べたところ、*Pcdh*-2種類と*Pcdh*-3種類はそれぞれが片側対立染色体のみに由来していた。これは、多様化クラスター型遺伝子が片側対立染色体レベルで制御されることを中枢神経系で初めて示した例である。この*Pcdh*-および-の組み合わせにより合計10万種類以上の多様性を生むこととなり、神経細胞の多様性を特徴づける機構となる可能性がある(Esumi et al, [Nature Genetics, 2005](#); [Kaneko et al, JBC, 2006](#))。

## 着想に至った経緯

片側対立染色体ごとに独立に発現制御されるためには、対立染色体を区別して働く転写制御シスエレメント(エンハンサーやサイレンサーなど)の必要性が予測される。実際に、嗅神経系において嗅覚受容体遺伝子の発現制御には対立染色体を区別して働く転写制御シスエレメントの関与が報告されている(Lomvardas et al, [Cell, 2006](#))。そこで、*Pcdh*クラスター内において転写制御シスエレメントとして働きうる領域を同定するため、動物種間で保存されているゲノム領域を*Pcdh*-遺伝子座において探索した。その結果、ヒトを含む全ての哺乳類で保存されている領域を2つ見いだした。研究代表者はこれらをSR領域およびT領域と名付け、遺伝子ターゲティングマウス作製に着手し、すでにSR領域欠損の生殖系列伝達キメラマウスを得ている。SR領域欠損マウスの作製が最終段階に到達し、個体レベルでの機能を解明できる状況が得られたこと

から、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究においては、*Pcdh*の転写制御シスエレメントの同定を目的として、*Pcdh*クラスター内において各動物種間で保存されているSR領域およびT領域が転写制御シスエレメントとして機能するか否かをマウス個体レベルで明らかにする。

### 何をどこまで明らかにしようとするのか

本研究期間においては、SR領域およびT領域が転写制御シスエレメントとして機能するか否かをマウス個体レベルで明らかにすることを目的として、以下の点を明らかにする。

- (1) SR領域およびT領域のクロマチン状態解明
- (2) SR領域およびT領域の遺伝子ターゲティングマウス作製
- (3) *Pcdh*クラスター内に存在する転写制御シスエレメント候補の網羅的*in situ*同定
- (4) SR領域欠損マウスにおける*Pcdh*発現の解明

## 3. 研究の方法

### (1) SR領域およびT領域のクロマチン状態解明

多くの遺伝子において、その遺伝子を発現する組織では対応する転写制御シスエレメントのクロマチン状態が活性状態(DNase高感受性領域)になることが知られている。そこで、本年度はSR領域とT領域の*Pcdh*-転写制御への関与を明らかにするため、培養細胞におけるこれら領域のDNase感受性を調べる。*Pcdh*を発現している培養細胞株(C1300)におけるSR領域とT領域のクロマチン状態を解析する。DNase高感受性領域の存在が確認できた場合には、さらなるDNase高感受性アッセイや詳細な相同性比較解析法を用いて、SR領域(約500 bp)、T領域(約2.5 kb)の中で中心的役割を果たす配列(コア配列)を同定する。これらにより、転写制御シスエレメントとして機能する可能性を検証できる。

## (2) SR領域、T領域およびHS5-1領域の遺伝子ターゲティングマウス作製

転写制御シスエレメント候補の生体内における機能や意義を明らかにするため、これら領域の欠損マウスをES細胞を用いた遺伝子ターゲティング法によって作成する。SR領域を2つの*LoxP*配列で挟んだ時期部位特異的コンディショナル欠損マウス作製を既に開始しており、現在、生殖系列伝達キメラマウスが生まれている(新潟大学 崎村健二先生との共同研究)。ネオマイシン耐性遺伝子を除去するため*F1p*マウス(東京大学 三品昌美先生との共同研究)との交配を行った後に、*Cre*発現マウスとの交配を行いSR領域欠損マウスを作製する。

また、本研究遂行中にアメリカのグループにより*Pcdh*-・発現のエンハンサー活性を持つHS5-1領域が報告された。しかし、彼らの報告では生きたマウス内でのエンハンサー活性を調べていない。そこで、本HS5-1領域についてもターゲティングマウスを作製し、マウス内での活性を調べることにした。

(3) *Pcdh*クラスター内に存在する転写制御シスエレメント候補の網羅的*in silico*同定  
一般に、転写制御シスエレメントは動物種間で保存されている(Nardone *et al*, *Nat Immunol.*, 2004)。実際に、研究代表者は*Pcdh*-・遺伝子座において高度に保存されている領域(SR領域およびT領域)を既に同定しており解析準備を進めている。本年度は、解析対象を*Pcdh*-・、-・、-・クラスター全体に拡大し、転写制御シスエレメント候補を網羅的に同定する。現在、様々な動物種のゲノム配列解読計画が進行中であるので、これらの情報を随時取り入れることで推定の精度を上げる。

## (4) SR領域欠損マウスにおける*Pcdh*発現の解明

初年度に作製したSR領域欠損マウスを用いて、SR領域欠損が*Pcdh*-・発現に及ぼす影響を解析する。これによりマウス生体内におけるSR機能を明らかにする。

SR領域欠損マウスの*Pcdh*遺伝子発現様式の全体像を(i)脳領域や発生時期それぞれにおけるバリエーションごとのRT-PCR法や定量的RT-PCR法による転写産物のサイズや量の解

明、(ii)単一プルキンエ細胞RT-PCR法によるアレルレベルでの発現様式の解明、(iii)イムノブロットによる*Pcdh*タンパク質の分子量や発現量の解明、(iv) *in situ*ハイブリダイゼーション法や抗*Pcdh-a*抗体(作成済み)による免疫組織化学染色法を用いた局在解明、により明らかにする。

## 4. 研究成果

まずSR領域およびT領域におけるクロマチン状態をDNase高感受性アッセイを用いて解析した。解析対象として、*Pcdh*-・を発現している培養細胞株C1300を用いた。その結果、T領域にはDNase高感受性部位が認められ、クロマチンが開いた状態であることが示唆された。そこで、T領域がエンハンサー活性を有するか否かをルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。しかし、有意なエンハンサー活性を検出することはできなかった。以上のことから、T領域はクロマチンが開いた状態であることが示唆された。また、その機能に関しては単純なエンハンサー活性以外の活性を持つ可能性が考えられる。一方、SR領域にはDNase高感受性部位が認められなかった。このことは、*Pcdh*-・を発現しているC1300細胞においてはクロマチンが閉じた状態であることを示唆している。

遺伝子改変マウス作製に関しては予定以上に進行した。SR領域欠損マウスは順調に作製でき、現在解析を進めている(解析結果は後述)。一方、HS5-1欠損マウスの作製も順調に進んでいる。常法に従い、部位領域特異的にHS5-1欠損させようようにゲノム配列を改変したES細胞を取得した。これを用いてキメラマウスを作製したところ、生殖系列キメラマウスを得ることができた。現在、解析に進むべくマウスの交配等を進めている。

*Pcdh*クラスター内に存在する転写制御シスエレメント候補の網羅的同定を行なった結果、SR領域、T領域、HS5-1領域に加えて、多数の進化的に保存された非コード領域を同定することができた。これらは*Pcdh*-・発現制御に何らかの機能を果たしていることが予想され、今後の有力な解析候補を得ることができた。

本研究にて作製したSR領域欠損マウスを用いて、*Pcdh- $\cdot$* の発現制御におけるSR領域機能の解析を行なった。In situハイブリダイゼーションにより、*Pcdh- $\cdot$* の発現部位の制御にはSR領域単独での欠損の影響はほとんどないことが明らかとなった。また、定量RT-PCRにより、組織レベルでの*Pcdh- $\cdot$* の発現量の制御にもSR領域単独での欠損の影響はほとんどないことが明らかとなった。さらに、単一神経細胞におけるRT-PCRによって、単一神経細胞レベルでの*Pcdh- $\cdot$* の発現選択性の制御にもSR領域単独での欠損の影響はほとんどないことが明らかとなった。以上の結果より、*Pcdh- $\cdot$* 発現制御メカニズムの複雑性と頑健性の一端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2件)

- (1) Ryosuke Kaneko, Masahumi Kawaguchi, Tomoko Toyama, Yusuke Taguchi, Takeshi Yagi.

Expression levels of Protocadherin-a transcripts are decreased by nonsense-mediated mRNA decay with frameshift mutations and by high DNA methylation in their promoter regions.

*Gene*, 2009, 430: 86-94. 査読有

- (2) Masahumi Kawaguchi, Tomoko Toyama, Ryosuke Kaneko, Teruyoshi Hirayama, Yoshimi Kawamura, Takeshi Yagi.

Relationship between DNA methylation states and transcription of individual isoforms encoded by the protocadherin-a gene cluster.

*J. Biol. Chem.*, 2008, 283: 12064-12075.

査読有

[学会発表] (計2件)

- (1) 金子涼輔、阿部 学、平林敬浩、内村有邦、崎村建司、柳川右千夫、八木 健  
神経細胞の多様化におけるプロトカドヘリン $\alpha$ のクラスター型ゲノム構造の関与  
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、2008. 12. 8~12、  
神戸

(2) 金子涼輔、阿部 学、崎村建司、八木 健  
プロトカドヘリン- $\alpha$  遺伝子クラスターにおける進化的に保存された非コード領域

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、2007. 12. 11~15、  
横浜

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

金子 涼輔 (KANEKO RYOSUKE)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40390695

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：