

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500287

研究課題名 (和文) CNR/プロトカドヘリン分子群における多様性の生理学的意義の解明

研究課題名 (英文) Analysis of physiological significance of Protocadherin diversity.

研究代表者

平林 敬浩 (HIRABAYASHI TAKAHIRO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教

研究者番号：40297015

研究成果の概要 (和文)：CNR/プロトカドヘリン α 分子群は、哺乳類を含む脊椎動物の脳神経系で発現する多様化膜分子群であり、これまでの研究結果から、軸索投射に関与する可能性が示唆されている。本研究では CNR/プロトカドヘリン α 分子群の多様性の意義を解明することを目的として、同遺伝子の分子的多様性を改変したマウスを作製した。これらの遺伝子改変マウスは外見上、野生型マウスとの相違は認められなかった。また各遺伝子改変マウスについて同遺伝子の発現量を解析したところ、全体の発現量に大きな変化は無かった。このことから CNR/プロトカドヘリン α 分子群には常に発現量を一定に保つ機構が存在することが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：The CNR/Protocadherin- α genes (*Pcdha*), which are expressed in the vertebrate brain, encode diverse membrane proteins whose functions are involved in axonal projection. In this study, to elucidate the physiological significance of CNR/*Pcdha* diversity, we deleted or duplicated the CNR/*Pcdha* gene cluster in mice. These mice were viable, and did not display any overt abnormalities. The expression level of all the CNR/*Pcdha* genes was unchanged in the all mutant mice. These results indicate that the *Pcdha* genes are comprehensively regulated as a cluster unit.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：プロトカドヘリン、ジーンターゲティング

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、個々の神経細胞が適切な相手とシナプス結合を形成するには、細胞膜表面分子群による多様化分子認識機構が想定される。CNR/プロトカドヘリン α は、哺乳類を含む脊椎動物の

脳神経系で発現する多様化膜分子群であり、ゲノム染色体上で遺伝子クラスターを構成している。マウスでは 14 種のファミリー分子 ($\alpha 1$ - $\alpha 12$, c1, c2) が存在し、いずれの CNR/プロトカドヘリン α も細胞外ドメインにカドヘリンモチーフを有する 1 回膜貫通型分子である。この 14 種類のファミリー分子は、染色体上に縦列した 14 個の可変領域

エクソンが、それぞれ共通の定常領域エクソンにスプライシングして発現する。この遺伝子クラスターは免疫系のT細胞受容体やイムノグロブリン遺伝子群と類似しており、この免疫系での遺伝子多様性が自己認識機構、獲得免疫、免疫記憶の分子的基盤となっていることを考えたとき、脳神経系における CNR/プロトカドヘリン α の遺伝子多様性の分子的役割は興味深い。

近年我々は、この CNR/プロトカドヘリン α の14種類のファミリーが個々のプルキンエ細胞では2-3種のアイソフォームを発現していること、また園組み合わせは細胞ごとに異なっていることを、Single-cell RT-PCR、in situ hybridization で明らかにした。また、この遺伝子発現は対立染色体で独立したものであり、今までにない新たな染色体レベルでの遺伝子調節機構が示唆されている。また、CNR/プロトカドヘリン α 分子群は、別に遺伝子クラスターを形成しているプロトカドヘリン γ 多様化分子群とタンパク質複合体を形成して、細胞膜表面に発現することが明らかとなっており、プロトカドヘリン γ ファミリーも個々の神経細胞で対立染色体レベルでの差次的遺伝子発現をしていることから、 α γ タンパク質複合体の組み合わせによる多様化膜分子群として機能していることが予想されている。

2. 研究の目的

脳神経系において個々の神経細胞に多様性を与える分子およびメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では多様化膜分子群 CNR/プロトカドヘリン α の可変領域エクソン数を変換（減少と増加）したマウスを用いて、神経細胞の多様化、神経回路形成、行動生理学的異常について解析し、脳神経系における CNR/プロトカドヘリン α の多様性の意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CNR/プロトカドヘリン α の可変領域エクソン数を変換した遺伝子改変マウスの作製

ジーンターゲティング法により遺伝子上の異なる位置に loxP 配列を挿入したマウスと精子形成時の対立染色体が対合する時期に Cre を発現する Sycp-Cre トランスジェニックマウス交配し、対立染色体で異なる位置にある loxP 配列間で Cre 依存的な遺伝子組み換えを起こすことにより、可変領域エクソンの数が変換（減少と増加）した CNR/プロトカドヘリン α 遺伝子クラスターをもつマウスを得た。

(2) CNR/プロトカドヘリン α mRNA 発現様式の解析

CNR/プロトカドヘリン α mRNA 発現量は Real-time PCR で定量した。また、組織内分布は各アイソフォーム特異的プローブを用いた in situ hybridization により解析した。

(3) 嗅神経投射の解析

嗅球における嗅神経投射への関与を調べるために匂い分子受容体のひとつである MOR23 遺伝子に lacZ 遺伝子をノックインしたマウスと可変領域エクソンの数が変換した Pcdh α 遺伝子クラスターをもつマウスを交配して得られたマウスの嗅球を X-gal 染色をした。

4. 研究成果

(1) CNR/プロトカドヘリン α の可変領域エクソン数を変換した遺伝子改変マウスの作製

CNR/プロトカドヘリン α 遺伝子上の任意の位置に loxP 配列を挿入した遺伝子改変マウス、および Sycp-Cre トランスジェニックマウスを利用して Pcdh α の分子的多様性を担っている可変領域エクソンを $\alpha 1$ のみにした変換したマウス (del. $\alpha 2$ -c2 マウス)、および $\alpha 2$ -c2 可変領域エクソンを重複させたマウス (dup. $\alpha 2$ -c2 マウス) を作製することが出来た。作製されたマウスはいずれも野生型マウスとの外見上の相違は認められず、正常に交配維持が可能であった。

(2) 各遺伝子改変マウスにおける CNR/プロトカドヘリン α mRNA の発現様式

両遺伝子改変マウスにおいて各アイソフォームの発現量を real-time PCR で定量した。その結果、del. $\alpha 2$ -c2 マウスでは1つだけ残存している可変領域エクソン由来の $\alpha 1$ アイソフォームの発現量は増加した。またその量は野生型マウスが発現している全 Pcdh α 分子の量と有意差はなかった。

一方、dup. $\alpha 2$ -c2 マウスでは重複した遺伝子上に2つ存在する $\alpha 4$, c2 アイソフォームの発現量に有意なさは認められなかったが、1つしか存在しない $\alpha 1$ アイソフォームは発現量が低下した。また、このマウスでも遺伝子型にかかわらず全 Pcdh α 分子の発現量に差はなかった。これらのことから Pcdh α 遺伝子には常に発現量を一定に保つ機構が存在すると考えられる。

また、in situ hybridization の結果、野生型マウスにおいて、Pcdh α アイソフォームは小脳プルキンエ細胞で差次的に発現しているが、del. $\alpha 2$ -c2 マウスではほぼ全てのプルキンエ細胞において発現が観察された。

(3) CNR/プロトカドヘリン α の多様性の嗅神経投射への関与

以前、Pcdh α 全分子種を発現しない遺伝子

ノックアウトマウスを作製し、匂い受容体遺伝子に lacZ 遺伝子をノックインしたマウスと交配することで嗅神経細胞の異常について解析したところ、嗅神経投射において異所性の糸球体が観察された。しかし、同様な実験を del. $\alpha 2-c2$ マウスで行ったところ、嗅神経投射に異常は観察されなかった。このことから嗅神経系における正確な神経投射には CNR/プロトカドヘリン α の分子的多様性は関与していない可能性が考えられた。

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) Kim-Kaneyama J, Takeda N, Sasai A, Miyazaki A, Masataka, Sata M, Hirabayashi T, Shibamura M, Yamada G, Nose K

Hic-5 deficiency enhances mechanosensitive apoptosis and modulates vascular remodeling.

J Mol Cell Cardiol. 50, 2011, 77-86, 査読有

2) Noguchi Y, Hirabayashi T, Katori S, Kawamura Y, Sanbo M, Hirabayashi M, Kiyonari H, Nakao K, Uchimura A, Yagi T

Total expression and dual gene-regulatory mechanisms maintained in deletions and duplications of the Pcdha cluster.

J Biol Chem. 284, 2009, 32002-14, 査読有

3) Uchimura A, Hidaka Y, Hirabayashi T, Hirabayashi M, Yagi T.

DNA polymerase delta is required for early mammalian embryogenesis.

Plos ONE 4, 2009, e4184, 査読有

4) Fukuda E, Hamada S, Hasegawa S, Katori S, Sanbo M, Miyakawa T, Yamamoto T, Yamamoto H, Hirabayashi T, Yagi T

Down-regulation of protocadherin- α A isoforms in mice changes contextual fear conditioning and spatial working memory.

Eur J Neurosci 28, 2008, 1362-1376, 査読有

5) Hasegawa S, Hamada S, Kumode Y, Esumi S, Katori S, Fukuda E, Uchiyama Y, Hirabayashi T, Mombaerts P, Yagi T

The protocadherin-alpha family is involved in axonal coalescence of olfactory sensory neurons into glomeruli of the olfactory bulb in mouse.

Mol Cell Neurosci. 38, 2008, 66-79, 査読有

[学会発表] (計 17 件)

1) 横田慎一、クラスター型プロトカドヘリンにおける選択的組み合わせ発現の制御機構の解析、第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 8 日、神戸コンベンションセンター

2) 金子涼輔、プロトカドヘリン- α 遺伝子の重複は発現と DNA メチル化を変化させる、33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 8 日、神戸コンベンションセンター

3) 金子涼輔、プロトカドヘリン- α 遺伝子の重複は発現と DNA メチル化を変化させる、Neuro2010、2010 年 9 月 4 日、神戸コンベンションセンター

4) 糸賀康人、大脳皮質においてプロトカドヘリン γ は細胞の形態及び生存を制御する、Neuro2010、2010 年 9 月 2 日、神戸コンベンションセンター

5) 横田慎一、クラスター型プロトカドヘリンにおける選択的組み合わせ発現の制御基盤の解析、日本分子生物学会 第 10 回春季シンポジウム、2010 年 6 月 7 日、ホテル松島大観荘

6) 金子涼輔、神経細胞に多様性を生み出す遺伝子発現制御：プロトカドヘリン α 遺伝子クラスターにおける確率的プロモーター選択、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、パシフィコ横浜

7) Itoga Y, Analysis of mice with disruption of gamma protocadherin genes in excitatory neurons., Neuroscience2009、2009年10月20日、Chicago

8) Itoga Y, Protocadherin γ in excitatory neurons regulate cell survival in cortex and hippocampus., Construction and Reconstruction of the Brain、2009年10月10日、淡路夢舞台

9) 香取将太、セロトニン神経におけるプロトカドヘリン α アイソフォームの解析、第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 17 日、名古屋国際会議場

10) 糸賀康人、Gamma-Protocadherin コンディショナルターゲットマウスの解析、第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 16 日、名古屋国際会議場

11) 金子涼輔、クラスター型プロトカドヘリン α の単一神経細胞における差次的発現の制御メカニズム、第32回日本神経科学大会、2009年9月16日、名古屋国際会議場

12) 内村有邦、DNA複製エラーを利用した実験室内哺乳類進化実験モデル系の構築、第11回日本進化学会大会、2009年9月2日、北海道大学

13) 金山朱里、細胞接着斑アダプター分子Hic-5のノックアウトマウス作製と解析、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、2008年12月12日、神戸ポートアイランド

14) 平林敬浩、クラスター型プロトカドヘリンの多様性を欠失した遺伝子改変マウスの解析、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、2008年12月10日、神戸ポートアイランド

15) Yokota S, Identification of enhancer element for clustered protocadherin-gamma gene.、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年12月10日、神戸ポートアイランド

16) 金子涼輔、神経細胞の多様化におけるプロトカドヘリン α 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年12月10日、神戸ポートアイランド

17) 内村有邦、DNA複製エラーを利用した変異マウス作製系についてーシングマウスの誕生、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年12月9日、神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし