

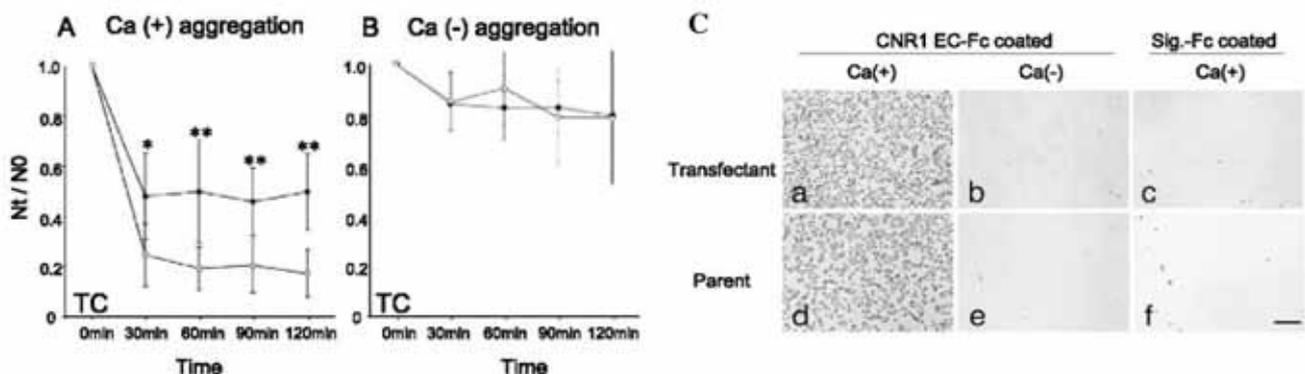
## 平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな		やぎ たけし					
研究代表者名氏		八木 健		所属研究機関・部局・職 大阪大学・大学院生命機能研究科・教授			
研究課題名	和文	神経回路形成・再編成における CNR ファミリーの生体内機能の解析					
	英文	Molecular mechanism for generating and regenerating neural network by CNR family					
研究経費		平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計
16年度以降は内約額 金額単位：千円		27,400	21,500	17,200	12,900	8,600	87,600
研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）	
八木 健		大阪大学・大学院生命機能研究科・教授		分子生物学		研究全般の遂行と総括	
浜田 俊		大阪大学・大学院生命機能研究科・助教授		神経生物学		シナプスでのCNRファミリーの役割研究	
当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>ほ乳類脳神経系における機能分子として Fyn チロシンリン酸化酵素が重要な役割をしていることが、Fyn 遺伝子欠損マウスの解析により明らかとなった。この Fyn タンパク質と脳神経系で結合する分子群の解析により CNR/プロトカドヘリン分子群が本研究グループにより単離・同定された。この CNR/プロトカドヘリンファミリーは、1)シナプス領域でのタンパク質の局在、2)単一神経細胞ごとに異なる発現様式、3)免疫グロブリンと類似した遺伝子クラスター構造、が明らかとなっている。</p> <p>本研究では、神経回路形成と再編成に関わる CNR/プロトカドヘリンファミリーの分子機能を明らかにすることにより、神経回路形成と再編成の分子メカニズム解明を目標とする。本期間中には、1)神経回路形成と再編成過程での、CNR/プロトカドヘリンファミリーのリガンドの解析、2)神経回路形成と再編成過程で CNR ファミリーが関与する細胞内情報伝達系の解析、3)遺伝子欠損マウスや遺伝子変換マウスを用いた、マウス神経回路形成と再編成過程での CNR/プロトカドヘリンファミリーの分子機能の解析を研究目的とする。</p>							

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

本研究では、CNR/プロトカドヘリンファミリーの分子機能の解析により、神経回路形成と再編成の分子メカニズム解明を目標として、1)神経回路形成と再編成過程での、CNR/プロトカドヘリン のリガンドの解析、2)神経回路形成と再編成過程で CNR/プロトカドヘリンファミリーによる細胞内情報伝達系の解析、3)遺伝子欠損マウスや遺伝子変換マウスを用いた、マウス神経回路形成と再編成過程での CNR/プロトカドヘリンファミリーの分子機能の解析、で研究を遂行している。

1)の研究計画において現在までに、CNR/プロトカドヘリン のリガンドを特定し、論文として報告した。CNR/プロトカドヘリン は他のカドヘリンと異なり、L 細胞や Neuro2A 細胞などでタンパク質を発現させても、細胞表面にほとんど発現しない。よって、CNR/プロトカドヘリンファミリーのリガンドを探るためには細胞表面で発現する細胞株を特定する必要がある。そこで我々はまず、CNR タンパク質を細胞膜に移行できる培養細胞株についての検討を行った。その結果、L, Neuro2A, CHO, MDCK, COS 細胞株では、CNR/プロトカドヘリン タンパク質はほとんど細胞膜外に移行しないが、HEK293T 細胞株のみで、強制発現タンパク質の一部が細胞膜外に移行することが確認された。この HEK293T 細胞を用いて CNR 1 タンパク質の細胞接着活性についての検討を行った結果、CNR 1 を強制発現させた HEK293T 細胞においては細胞外 Ca 依存的な細胞接着能の亢進が認められた。当初、この細胞接着活性は CNR1 と CNR1 同士によるホモフィリックな細胞接着能であることが予想されたが、この CNR 1 発現細胞の細胞接着活性は、CNR1 を強制発現していない HEK293T 細胞にも Ca 依存的な細胞接着能を示すことが明らかとなった。また、CNR1 タンパク質をコートしたビーズを用いて CNR1 タンパク質同士のホモフィリックな結合活性を検討したところ E-カドヘリンでは、結合活性が示されたものの CNR1 タンパク質同士の結合活性は確認できなかった。しかし、CNR1 タンパク質をコートしたシャーレに親 HEK293T 細胞が細胞外 Ca 依存的に接着した。



A, B, CNR1 発現 HEK293T 細胞 (白丸) HEK293T 細胞 (黒丸) を用いた細胞接着能実験。TC:トリプシン Ca により細胞を解離させた後に、細胞外 Ca あり (A), なし (B) で細胞凝集の時間経過を示す。細胞外 Ca の条件で CNR1 発現 HEK293T 細胞の凝集 (Nt/No) の低下が認められる。C, CNR1 タンパク質をコートしたシャーレへの CNR1 発現 HEK293T 細胞 (transfectant) HEK293T 細胞 (Parent) の接着。細胞外 Ca 存在下で親 HEK293T 細胞が接着する。HEK293T 細胞に内在するインテグリンと CNR1 タンパク質の相互作用によるものである。

この系を用いて、HEK293T 細胞と細胞接着活性を持つ CNR1 タンパク質の領域を特定する為に、CNR1 各タンパク質領域での細胞接着能を測定した。その結果、CNR1 の第一カドヘリンドメインの RGD モチーフが、HEK293T 細胞との細胞外 Ca 依存的な細胞接着能に必要なことが明らかとなった。次に、HEK293T 細胞で発現する分子の特定を行った結果、インテグリン抗体や RGD ペプチドを用いることにより CNR1 タンパク質依存的な細胞接着がなくなることなどにより、HEK293T 細胞で発現するインテグリンと CNR1 タンパク質が結合することが明らかとなった。これらの結果より、本年度までに CNR1 タンパク質のリガンドとしてインテグリンが明らかとなった。また、この CNR1 タンパク質のインテグリン結合部位が、先に報告した CNR1 タンパク質とリーリントンタンパク質の結合領域と一致していた。インテグリンと結合する EC1 領域は CNR/プロトカドヘリン アイソフォーム間で極めて高い相同性があり、CNR/プロトカドヘリン が共通してインテグリンとの相互作用をする可能性が示唆された。

また、CNR/プロトカドヘリン に関連して、Fyn 欠損マウスにおける大脳皮質形成過程の異常、ほ乳行動異常を解析して報告した。更に、現在までに CNR/プロトカドヘリン 及びプロトカドヘリン の各共通細胞質領域に対する特異抗体、CNR/プロトカドヘリン 変換マウスを作製をすることができた。

特記事項（これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。）

独創性・新規性を格段に発展させる結果は特にない。

本研究により CNR/プロトカドヘリン タンパク質の細胞外カルシウム依存的細胞接着能がはじめて示された。この結果は、CNR/プロトカドヘリン が脳神経系で細胞接着分子群として働いている可能性を示唆するものである。シナプスは、神経細胞同士の細胞接着領域であり、このシナプスの多様性が、神経回路網の基盤となっていることが示唆されている。本研究で明らかになった CNR/プロトカドヘリン の細胞接着能は、この点でシナプス結合部における神経回路網形成での新たな分子的基盤に関わることを予想させるものである。

また本研究において、CNR/プロトカドヘリン 同士のホモフィリックな細胞接着能はほとんどないことが明らかとなった。この結果は、一般的に知られているカドヘリンファミリーの同種カドヘリン同士のホモフィリックな細胞接着活性でない新たな分子機構を示唆するものである。この点で、CNR/プロトカドヘリン の細胞接着活性については、カドヘリンスーパーファミリーの新たな細胞接着活性への関与を示唆するものである。

本研究では CNR/プロトカドヘリン のヘテロフィリックな細胞接着活性がインテグリンタンパク質とあることが示された。脳神経系において、インテグリンファミリーは、神経前駆細胞への増殖能、神経細胞の移動、シナプス可塑性への役割などへの関与が示唆されている。しかし、インテグリンファミリーは、もともとファイブネクチンなどの細胞基質との細胞接着分子として捉えられており、細胞間接着活性についてのリガンドについてはその分子機能に関与する神経細胞やシナプスにおけるリガンドについては十分に明らかにされていない。最近、脳神経系においてインテグリンがリーリントンタンパク質と相互作用することが報告されており、CNR1 タンパク質とリーリントンタンパク質とのインテグリンを介した新たなタンパク質相互作用が示唆される。

また、インテグリン欠損マウスの解析、RGD ペプチドによるインテグリン阻害実験において、インテグリンファミリーがシナプス可塑性に関与する報告がある。CNR/プロトカドヘリン 分子群のシナプス領域での局在を考えるに、シナプス領域での CNR/プロトカドヘリン とインテグリンファミリーとの相互作用は、シナプス可塑性の新たな分子メカニズムとなることが予想される。CNR/プロトカドヘリン のシナプス可塑性や学習・記憶への関与については、本研究での遺伝子欠損マウスの結果を待つ必要があるが、学術的にも興味深いものとなると考える。

本研究では、新たな学術的問題提起があった。今まで CNR1 タンパク質の細胞接着活性を調べる実験では、強制発現させた CNR1 タンパク質が、L、Neuro2A 細胞において細胞膜表面に移行しないことがあり、かなり困難であった。しかし本研究によりはじめて、HEK293T 細胞において強制発現させた CNR1 タンパク質が細胞表面に出ることが明らかとなった。この結果は、CNR/プロトカドヘリン タンパク質の細胞膜表面移動での制御メカニズムがあることを示唆する。実際、CNR/プロトカドヘリン タンパク質は、シナプス膜領域にありながら、細胞内膜系での局在が示唆されており、内膜系から細胞表面へのタンパク質移動の制御メカニズムの存在が予想される。膜タンパク質の細胞膜表面への移動メカニズムは、免疫系での T 細胞受容体などでも知られており、タンパク質機能制御での重要なメカニズムであることが知られている。本研究の解析により、CNR/プロトカドヘリン タンパク質の細胞膜移動のメカニズムを培養細胞系で解析できる可能性が示唆された。シナプス形成、再編成、機能制御への新たな知見が考えられ、興味深い。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

#### 【論文】

1. Yuasa S, Hattori K, & Yagi T : Defective neocortical development in Fyn-tyrosine-kinase-deficient mice ; **Neuro Report** , 15(5):819-822(2004)
2. Sugino H , Yanase H, Hamada S, Kurokawa K, Asakawa S, Shimizu N & Yagi T. : Distinct genomic sequence of the CNR/Pcdh genes in chicken : **Biochemical and Biophysical Research Communications** 316(2):437-445 (2004)
3. Mutoh T , Hamada S, & Yagi T: Cadherin-related Neuronal Receptor 1(CNR1) has cell-adhesion activity with  $\beta 1$  integrin mediated through the RGD site of CNR1; **Experimental Cell Research**, 294:494-508(2004)
4. Yanase H, Sugino H, and Yagi T: Genomic sequence and organization of the family of *CNR/Pcdha* genes in Rat, **Genomics**, 83(4):717-726(2004)
5. Sugino H, Miyazaki M , & Yagi T : Intron-less processed cadherin-related neuronal receptor (CNR/Pcdha) genes in the central nervous system ;**Biochemical and Biophysical Research Communications**, 313:775-783(2004)
6. Hamaguchi-Hamada K , Sanbo C, Hamada S, Yagi T : Exposure to hexanal odor influences maternal behavior and induces neonatal death in Fyn tyrosine kinase-deficient mice, **Neurosci. Res.**, 48:259-267(2003)
7. Cowen MS, Schumann G, Yagi T, Spanagel R. : Role of Fyn tyrosine kinase in ethanol consumption by mice. **Alcohol Clin Exp Res**. 2003 Aug; 27(8): 1213-1239.
8. Taniguchi M, Nagao H, Takahashi Y, Yamaguchi M, Mitsui S, Yagi T, Mori K, & Shimizu T : Distorted Odor Maps in the Olfactory Bulb of Semaphorin 3A-Deficient Mice, **The Journal of Neuroscience**, 23(4)1390-1307 (2003)
9. Sasaki Y, Cheng C, Uchida Y, Nakajima O, Ohshima T, Yagi T, Taniguchi M, Nakayama T, Kishida R, Kudo Y, Ohno S, Nakamura F, & Goshima Y : Fyn and Cdk5 Mediate Semaphorin-3A Signaling, Which is Involved in Regulation of Dendrite Orientation in Cerebral Cortex, **Neuron** 35, 907-920 (2002)
10. Hironaka N, Yagi T, & Niki H : Light-potential of acoustic startle response (ASR) and monoamine efflux related to fearfulness in Fyn-deficient mice, **Molecular Brain Research** 98, 102-110 (2002)

#### 【国際会議】

1. 八木 健 : Diversity of CNR/protocadherin genes in the brain International Symposium , Dynamics of Neural Development , 千里ライフサイエンスセンター2003/8/10
2. 八木 健 : Protocadherins in brain development , Max-Planck-Institute for Experimental Medicine Gottingen, Germany "Molecular genetics of morphoregulatory process-From stem cells to complex cellular networks" , 2002/10/12
3. 八木 健 : Diversity of CNR Family Genes in the Brain , 京王プラザインターコンチネンタルホテル、UEHARA MEMORIAL FOUNDATION SYMPOSIUM-2002 "Genomic Science -Towards a New Paradigm" , 2002/6/4

#### 【学会】

1. 八木 健 : 「Diversity of CNR/protocadherin genes in the brain 第76回日本生化学会大会 パシフィコ横浜 2003/10/18
2. 八木 健 : 「Diversity of cadherin-related neuronal receptor (CNR) genes in the brain」、新潟コンベンションセンター(新潟市万代島 6-1)、第46回神経化学会大会 シンポジウム「ヒトはなぜその行動をとるか」、2003/9/25
3. 八木 健 : 「脳に存在する多様化分子群 CNR/protocadherin ファミリー」、基礎生物学研究所平成14年度基礎生物学研究所共同利用研究会[動物行動プログラムの遺伝・生物学的基盤]、2002/12/20