

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
Molecular mechanism for generating and regenerating
neuronal network by CNR family

八木 健 (YAGI, Takeshi)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授



研究の概要

脳神経系は多様化した細胞種が高度に組織化されたシステムである。本研究では脳神経系で発現する多様化受容体型分子群、CNR/プロトカドヘリンを用いて多様化した神経細胞、神経回路形成における分子メカニズムの解析を行った。その結果、この分子群が個々の神経細胞の多様性、神経回路形成に関わることを明らかにした。

研究分野/科研費の分科・細目/キーワード

総合・新領域系 複合領域/神経科学 神経化学・神経薬理学/カドヘリン、神経回路、脳、ゲノム、シナプス、多様性、神経細胞

1. 研究開始当初の背景・動機

脳は複雑なシステムであり、多様化した神経細胞から構成されている。私たちは脳神経系で発現する多様化膜分子群、CNR/プロトカドヘリン分子群を同定した。このCNR/プロトカドヘリンは、免疫グロブリンと類似した遺伝子クラスター構造をもち、シナプス領域でのタンパク質局在、単1神経細胞ごとに異なる発現様式が明らかとなっていた。しかし、このCNR/プロトカドヘリンの分子機能、生体内での機能については十分に明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、神経回路形成と再編成に関わるCNR/プロトカドヘリン分子群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して研究を行った。

3. 研究の方法

1) CNR/プロトカドヘリンタンパク質に対する特異抗体を作製し、タンパク質の機能と局在、結合タンパク質を微量高速冷却遠心機、高速冷却遠心機を用いた。

2) CNR/プロトカドヘリン遺伝子欠損及び変換マウスを作製し、生体内での機能を核酸自動分離装置、恒温震とう機、クリーンラックを用いて解析した。

3) 単1プルキンエ細胞を用いた遺伝子発現系を開発し、CNR/プロトカドヘリンの発現様式をマイクロトーム、リアルタイムPCRシステム、遺伝子増幅装置を用いて解析した。

4. 研究の主な成果

1) CNR/プロトカドヘリンファミリーのリガンドの解析：マウス CNR1 (CNR/プロトカドヘリン α 4) タンパク質と相互作用する分子を明らかにする目的で、CNR1発現HEK293T細胞を用いてCNR1とインテグリン分子との結合活性を明らかにした。この活性はCNR1の第1カドヘリン領域(EC1)にあるRGD (Arg-Gly-Asp)配列によるものであった(Mutoh et al 2004)。更に、CNR1のホモフィリックな結合活性が無いこと、細胞外Mnが結合活性に必須であること、 β 1インテグリン活性化抗体(TS2/16)により細胞外Mn依存性が無くなることを明らかにし、CNR1が活性化型インテグリン分子と結合して細胞外Ca依存的な細胞接着に関与することを明らかにした(Morishita et al 2006)。また、このCNR1EC1領域についてNMRスペクトロスコーピー法によるタンパク質構造解析を行ない、世界で始めてプロトカドヘリンファミリーのタンパク質構造決定に成功した。この構造解析により、活性化インテグリンとの相互作用するRGD配列、プロトカドヘリン分子群でよく保存されているCXXXXXC配列が構造の表面に位置していることが明らかとなった。更に古典的カドヘリンに存在するホモフィリック結合ポケット構造がCNR1では認められないことを明らかにした(Morishita et al 2006)。これらの結果はCNR/プロトカドヘリンが古典的カドヘリンとは異なる機能分子群であることを示さすものであり、新たな分子メカニズムの存在が予想された。

2) CNR ファミリーが関与する細胞内情報伝達系の解析: CNR/プロトカドヘリン α がマウス大脳皮質の神経回路形成期に一致して、サブプレート神経細胞及び視床皮質路、皮質遠心路の軸索に強い発現していることを明らかにした。更に α タンパク質はミエリン形成に関連して発現減衰することを明らかにした。興味深いことにミエリン形成不全マウス(シバラーマウス)では α タンパク質の発現減衰が大きく遅れることが明らかとなり、神経回路形成過程におけるミエリン形成と α タンパク質の機能との関連性が新たに示唆された

(Morishita et al 2005)。ミエリン形成は脳機能や神経回路形成の臨界期形成に関連していることが明らかとなっており、 α タンパク質が神経回路形成の成熟化に関連している可能性が新たに示唆された。

また、CNR/プロトカドヘリン α タンパク質と γ タンパク質がタンパク質複合体を形成し、細胞膜表面に発現することを明らかにした。多様化タンパク質同士が複合体を形成してより多くの多様化をもたらす免疫グロブリン(L鎖とH鎖)やT細胞受容体(α と β)同様であり興味深い(Murata et al 2006)。

3) 遺伝子欠損マウスを用いた CNR/プロトカドヘリンファミリーの分子機能の解析: CNR/プロトカドヘリン α 遺伝子クラスター共通エクソン欠損マウス、スプライシングバリエーションA型及びB型欠損マウス作製を行い、これらの遺伝子欠損マウスを用いて、 α 遺伝子が嗅神経回路形成において必要であることを明らかにした。

4) 単一プルキンエ細胞における差次的発現と新たな遺伝子制御機構の発見:

小脳プルキンエ細胞を用いた単一神経細胞遺伝子発現解析系を新たに開発し(Esumi et al 2006)、個々のプルキンエ細胞における α ファミリーと γ ファミリーの遺伝子発現制御について詳細に解析した。その結果、 α ファミリーの各アイソフォームが個々のプルキンエ細胞ごとに異なった組み合わせで発現していることを明らかにした。また、C57BL/6とMSMのF1マウスにおける小脳プルキンエ細胞を用いた解析より、各アイソフォームの発現が対立染色体遺伝子クラスターで独立した遺伝子制御によるものであることが明らかとなった(Esumi et al 2005; Kaneko et al 2006)。この遺伝子発現は、今までにない新たな遺伝子制御機構であることが示唆された。

以上、本研究により CNR/プロトカドヘリンファミリーが個々の神経細胞の多様化、神経回路形成、細胞接着に関わる多様化膜分子群であることが示唆された。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

本研究では競合の中、世界に先駆けて CNR/プロトカドヘリンが個々の神経細胞多様化、神経回路形成に関わることを明らかにした。また、神経細胞での新たな遺伝子制御機構を明らかにし、脳の多様化システム理解への学術的インパクトを与えた。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)
Esumi S, Kaneko R, Kawamura Y, & **Yagi T**. Split single cell RT-PCR analysis of Purkinje cells. **Nature Protocols** 1, 2143-2151, (2006).

Morishita H, Umitsu M, Murata Y, Shibata N, Udaka K, Higuchi Y, Akutsu H, Yamaguchi T, **Yagi T**, & Ikegami T. Structure of the CNR/Protocadherin- α first cadherin domain reveals diversity across cadherin families. **J Biol Chem** 281,33650-33663, (2006).

Kaneko R, Kato H, Kawamura Y, Esumi S, Hirayama T, Hirabayashi T, & **Yagi T**. Allelic gene regulation of protocadherin- α and - γ clusters involving both monoallelic and biallelic expression in single Purkinje cells. **J Biol Chem** 281, 30551-30560, (2006).

Esumi S, Kakazu N, Taguchi Y, Hirayama T, Sasaki A, Hirabayashi T, Koide T, Kitsukawa T, Hamada S, & **Yagi T**. Monoallelic yet combinatorial expression of variable exons of the CNR/Protocadherin- α gene cluster in single neurons. **Nature Genet** 37, 171-176, (2005).

Morishita H, Kawaguchi M, Murata Y, Seiwa C, Hamada S, Asou H, & **Yagi T**. Myelination triggers local loss of axonal CNR/Protocadherin α family protein expression. **Eur J Neurosci** 20, 2843-2847, (2004).

Murata Y, Hamada S, Morishita H, Mutoh T, & **Yagi T**. Interaction with Protocadherin- γ regulates the cell-surface expression of Protocadherin- α . **J Biol Chem** 279, 49508-49516, (2004).

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/yagi/index.htm>