

研究課題別評価

1. 研究課題名 : 多様な中枢神経系のプロトカドヘリンによる形態形成の制御

2. 研究者氏名 : 平野 伸二

3. 研究の狙い :

高等動物の中枢神経系は、多様に機能分化した神経細胞が複雑な神経回路を形成している。このような神経系の形成には細胞間相互作用が非常に重要な役割を果たしていると考えられているが、その分子メカニズムについては未だ十分解明されていない。プロトカドヘリンはカドヘリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であり、1)非常に多くの種類があること、2)その多くが神経系に特異的に発現していること、3)サブファミリーの違いにより細胞内領域のアミノ酸配列が全く異なることなどの特徴がある。従って、プロトカドヘリンは神経系で様々なシグナル伝達経路をともなった複雑な細胞間相互作用に関与している可能性が高く、私はこの一連のプロトカドヘリン分子群が神経回路形成など神経系形成の鍵を握る分子であると考えている。

本研究では、プロトカドヘリンの神経回路形成における役割の解明を目的とし、私が発見したOLプロトカドヘリンを中心に1)ゲノム構造の、2)プロトカドヘリンの発現分布、3)細胞内局在、4)シグナル伝達系、5)生体内での機能などについて3年間にわたり解析を行った。

4. 研究結果 :

(1)OLプロトカドヘリンのゲノム構造

既知のプロトカドヘリンの中には遺伝子群をつくっているものが知られており、OLプロトカドヘリン遺伝子が一つか、あるいは遺伝子クラスターをつくっているかはその機能を考えるうえで大きな問題である。そこで、BACクローンを単離し、近傍には他のプロトカドヘリンの遺伝子はないことを確認した。既に行っていた染色体 *in situ* ハイブリダイゼーションの結果とあわせて考えるとOLプロトカドヘリン遺伝子は一つであることが分かった。また、エクソン-イントロンの構造を決定したところ、他のプロトカドヘリンと同じく、第1エクソンが分子のほとんどをカバーしており、4つの小さなエクソンが付加されて分子ができあがることが分かった。これらの情報をもとに第1エクソンのほとんどを欠失するノックアウトマウスの作製を(4)で行った。

(2)プロトカドヘリンの発現分布

プロトカドヘリンの機能を推測するため、その分布を知る必要がある。まずマウスの生後の脳におけるOLプロトカドヘリンタンパクの分布を詳細に解析した。その結果、このタンパク質が様々な神経核に区画をつくって分布すること、さらに嗅覚系、オリブ核、小脳皮質投射系、視覚系など特定の神経回路の一部に沿って分布することが明らかになった。また、ドイツのレディス博士らと共同研究でニワトリOLプロトカドヘリンについて分布を調べたところ、発生後期の脳では、視覚系の神経回路に沿って分布が見られた。また、ニワトリ、マウスとも発生初期の神経系ではOLプロトカドヘリン陽性の線維が顕著に見られた。これらのことは、この分子が神経回路形成に重要な役割を果たしている可能性を示唆していた。

一方、別のファミリーであるプロトカドヘリン2Aの発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより調

べた。その結果、プルキンエ細胞や視覚系の一部の神経核、さらに上衣細胞の一部に特異的な発現が見られることが明らかになった。

(3) 細胞内局在

OL プロトカドヘリンの機能を知るために細胞内局在を検討した。マウス17日胚の海馬台の初代培養1週間目では樹状突起にもあるが、軸索などでは点状に分布していた。特に成長円錐に濃縮していることも観察された。従って、OL プロトカドヘリンは、軸索の走行や標的の認識に関与することにより、神経回路形成に関与する可能性が考えられた。さらに2週間ほど培養すると一部はシナプスにあるらしいことがわかった。

一方、副嗅球のグロメルラスでは、生後3週間を経ても発現が強く続くという特殊な発現パターンを示す。免疫電顕により局在を調べると、ミエリン化が起こる時に一過性に軸索のまわりに局在が見られた。この観察は、この分子がミエリン化の初期の細胞間相互作用に機能している可能性を示唆している。

(4) シグナル伝達機構について

OL プロトカドヘリンのシグナル伝達機構を明らかにするために結合分子の同定を試みた。既存の抗体による免疫沈降法やイースト2ハイブリッドシステムなど試みたが、候補となるものは得られなかった。GST プルダウン法では、細胞内領域に結合する分子の候補として ROCK が得られたが、培養細胞内での結合は確認できなかった。つぎに細胞外領域に FLAG タグをつけた分子を培養細胞に導入してタグ抗体により免疫沈降したところ、4つのバンドが検出された。今後これらの4つの成分の解析をすすめる必要があるが、一方で再度免疫沈降できる抗体を作製するなどの見直しが必要である。

(5) OL プロトカドヘリンの生体内での役割

OL プロトカドヘリンの生体内での役割を明らかにするために OL プロトカドヘリン遺伝子を欠損するノックアウトマウスを作製した。ノックアウトマウスはレキシコンジェネミック社から得た。このマウスは見かけ上大きな異常は無く生まれてくるが、やがて成長不良となり数週間で死んだ。発生期の脳組織を調べると、末梢神経系のパターンには影響がなかったが、中枢神経系の皮質脊髄路、視床皮質路、皮質視床路、黒質線状体経路など大脳基底核付近の神経回路に走行異常などが見られることが明らかになった。このことから OL プロトカドヘリンはこれらの神経回路形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

本研究の成果は、OL プロトカドヘリンがいくつかの神経回路の形成に必須であることを示した点である。このプロトカドヘリンが形成に関与する皮質脊髄路は手足の随意運動を支配しておりまたそのほかの神経回路も乳児の発達に重要な働きをしている。今のところ遺伝病などとの関連は見つかっていないが、今回の発見は胎児から乳児期の神経発達やその障害を理解するうえで医学的にも重要な知見になると考えられる。

5. 自己評価：

本研究では、プロトカドヘリンという分子の生体内での役割について明らかにすることを目標とし、そのためにいくつかの事柄を行った。結合分子の同定ができなかったなど不十分な点も多かったが、分布の解析、ノックアウトマウスでの解析は興味深い結果を得た。これまで知られている細胞接着分子の中でこれほど顕著に神経回路形成に異常がでるものは少なく、本研究の価値は高い。個別の解析では以下の通りである。

(1)ゲノムの構造については、予定通り済んだが、遺伝子が1つであったためそれ以上の解析は必要がなかった。構造上の新規な発見はなかったが、ノックアウトマウスの作製などの基礎的なデータとして結果を利用した。達成度60%。

(2)分布については、マウス、ニワトリについて詳細に検討することができた。神経回路の一部に沿って分布していることを記載したのは地味ではあるが重要である。発生期の分布について発表には至っていないが、ニワトリについては今後小さな論文にまとめたいと考えている。その他のプロトカドヘリンの発現分布については、プロトカドヘリン2Aについての発現パターンを記載した。達成度85%。

(3)細胞内局在については、蛍光顕微鏡レベルではその概要がわかったが、シナプスとの関係など最終的なつめはまだ不十分である。また、既存の抗体の性質により免疫電顕が十分にできなかった。達成度60%。

(4)シグナル伝達機構の解析については、結合分子の同定ができず不十分な結果に終わった。再度抗体を作りなおすなど抜本的なやり直しが必要であると考えられる。達成度10%。

(5)ノックアウトマウスの解析については、予定より時間がかかっていることがマイナス点だが、非常に興味深い表現型が観察された。本研究の目的を遂行するにはまだOLプロトカドヘリンが神経回路形成にどのように関わっているかを分子レベルで明らかにする必要があり、今後の解析が期待される。達成度70%。

以上のことを総合的に自己評価をすると50%程度の達成度である。本研究課題については期間終了後も引き続き行っていく予定である。ノックアウトマウスの解析についてはなるべく早く完了させるとともに、シグナル伝達経路の解明など達成できなかった点についても追求をしていきたいと考えている。

6. 研究総括の見解：

神経系形成におけるプロトカドヘリンの役割にアプローチするのが本研究の目的であった。プロトカドヘリンは本研究者のオリジナルな研究対象であり、研究課題そのものの意義と重要性は大きい。

KOマウスの解析に時間を要したこともあって解析はOLプロトカドヘリンに終始したが、OLプロトカドヘリンについては十分な成果を挙げた。課題は個人研究の域を超えるものであり、3年間の

研究としては目的を達成し期待通りの成果を得たと評価でき、今後の発展が十分期待できる。

7. 主な論文等：

主な論文

1. Hirano, S., Wang, X., and Suzuki, S.T. Restricted expression of protocadherin 2A in the developing mouse brain. *Molecular Brain Res.* 98, 119-123, 2002 .
2. Redies C, Kovjanic D, Heyers D, Medina L, Hirano S, Suzuki ST, Puelles L. Patch/matrix patterns of gray matter differentiation in the telencephalon of chicken and mouse. *Brain Res Bull.* 57(3-4):489-493, 2002.
3. Aoki, E., Kimura, R., Suzuki, S.T., Hirano, S. Distribution of OL-protocadherin protein in correlation with specific neural compartments and local circuits in the postnatal mouse brain. *Neuroscience.* 117(3):593-614, 2003.
4. Hirano, S., Suzuki, S.T., Redies, C. The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. *Front Biosci.* 8:d306-355, 2003
5. Muller, K., Hirano, S., Puelles, L., Redies, C. OL-Protocadherin Expression in the Visual System of the Chicken Embryo. *J. Comp. Neurol.* In press.

講演

1. 2001年 10月 三菱化学生命化学研究所セミナー

その他

1. 青木英子、平野伸二、鈴木信太郎、*Neuro 2001* 第24日本神経科、第44回日本神経科学合同大会 要旨集40巻275ページ、2001年
2. 青木英子、平野伸二、鈴木信太郎、2002年 第25日本神経科学大会 要旨集40巻200ページ、2002年