



Title	Elucidation of the Role of Protocadherin Gamma C4 in Neuronal Development and Survival
Author(s)	樋口, 流音
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105270
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 (樋 口 流 音)	
論文題名	Elucidation of the Role of Protocadherin Gamma C4 in Neuronal Development and Survival (神経細胞の発生と生存におけるProtocadherin Gamma C4の機能解明)
論文内容の要旨	
The construction of functional neural circuits requires precisely regulated, membrane protein mediated cell-cell connections that orchestrate recognition, adhesion, and downstream signaling. Disruption of these interactions derails circuit assembly and is implicated in autism spectrum disorder, intellectual disability, and other neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. In this dissertation, I focused on clustered protocadherins (cPcdhs), a family of more than 50 cadherin-related adhesion isoforms, as regulators of neuronal connectivity. Previous studies have shown that mice lacking all isoforms of clustered protocadherins exhibit neonatal lethality with massive neuronal apoptosis. Here, to elucidate the molecular mechanisms in neural circuit formation, I investigated the role of Protocadherin gamma C4 (Pcdh-γC4), a member of the clustered protocadherin family, in regulating neuronal survive and dendritic development. Firstly, I utilized a novel CRISPR/Cas9 strategy (Double Mutation Inducing Open reading frame switch, DOMINO method) to generate Pcdh-γC4 knockout and alone expression mice to examine its function <i>in vivo</i>. My results demonstrate that Pcdh-γC4 is crucial for neuronal survival and dendritic formation in Purkinje cells, with loss of Pcdh-γC4 leading to abnormal apoptosis and dendritic self-crossing. Rescue experiments, where only Pcdh-γC4 was expressed among the 22 Pcdh-γ cluster, restored these phenotypes. Furthermore, I identified that the FAK/PYK2 signaling pathway is regulated by the intracellular domain of Pcdh-γC4, highlighting its unique functional role among the Pcdh-γ cluster. Next, further dissected the functional domains of Pcdh-γC4 by generating novel mouse models with deletions in the extracellular cadherin domain (EC2) and the variable intracellular domain (VCD). My findings reveal that both domains are essential for the survival in mice and neurons, and that the functional loss of Pcdh-γC4 results in Bax-dependent apoptosis. Yet the precise molecular mechanisms by which Pcdh-γC4 dependent apoptosis have not been uncovered. Finally, to address this black box, I explored specifically binding molecules to Pcdh-γC4 in mouse brain. Using "γC4only" mice, which only Pcdh-γC4 is expressed within the 22 Pcdh-γ cluster, I identified the STRIPAK (Striatin interacting phosphatase and kinase) complex as a novel binding partner through immunoprecipitation and mass spectrometry. The STRIPAK complex, known to regulate processes such as axon elongation, dendrite formation, and apoptosis. Further analysis in HEK293T cells confirmed that Strn, Strn3, Strn4, and Strip1 physiologically interact with Pcdh-γC4. These findings highlight the existence of a Pcdh-γC4-STRIPAK-mediated signaling pathway that regulates neuronal apoptosis and orchestrates dendritic arborization in Purkinje cells. This research demonstrated the essential role of Pcdh-γC4 in neuronal development and survival, providing insights into the molecular networks that govern neuronal fate determination and the potential mechanisms leading to neurodegenerative diseases.	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (樋口流音)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	八木 健
	副 査	教授	池田 史代
	副 査	教授	古川 貴久
	副 査	教授	立花 誠
論文審査の結果の要旨 機能的な神経回路の構築には、認識・接着・下流シグナル伝達を統合して制御する、膜タンパク質を介した精密に調節された細胞間結合が不可欠である。これらの相互作用が破綻すると神経回路の形成が妨げられ、自閉スペクトラム症、知的障害、その他の神経発達疾患および神経変性疾患の発症に関与することが知られている。 樋口流音さんは、神経結合の制御因子として、50種類以上のカドヘリン関連接着分子アイソフォームからなる clustered protocadherin (cPcdhs) ファミリーの一員である Protocadherin gamma C4 (Pcdh-γC4) に注目し、神経細胞の生存および樹状突起発達の制御における役割を解析した。まず、新規CRISPR/Cas9戦略であるDOMINO法 (Double Mutation Inducing Open reading frame switch) を用いて、Pcdh-γC4ノックアウトマウスおよびPcdh-γC4単独発現マウスを作製し、そのin vivo機能を検証した。その結果、Pcdh-γC4はブルキンエ細胞における神経細胞生存と樹状突起形成に必須であり、Pcdh-γC4の欠損は異常なアポトーシスおよび樹状突起同士の自己交差の増加を引き起こすことを明らかにした。さらに、22種類からなるPcdh-γクラスターのうちPcdh-γC4のみを発現させるレスキュー実験により、これらの表現型が回復することを示した。次に、Pcdh-γC4の機能ドメイン解析を、細胞接着活背に関わるEC2ドメインおよび可変細胞内ドメイン (variable intracellular domain、VCD) について、ドメイン欠失マウスを作製して、両ドメインがマウスおよび神経細胞の生存に必須であることブルキンエ細胞の樹状突起形成に必須であることを明らかにした。また、VCDに特異的に結合するSTRIPAK (Striatin interacting phosphatase and kinase) 複合体を同定した。これらの結果は、神経発達および神経細胞生存におけるPcdh-γC4の必須の役割を分子レベルで明らかに自他ものであり、神経細胞の運命決定を制御する分子ネットワークおよび神経変性疾患のメカニズムを理解する新たな知見を提供するものであり、研究の質量ともに優れたものであり、博士の学位を授与するに値するものと認める。なお、チェックツール“iThenticate 2.0”を使用し、剽窃、引用漏れ、二重投稿等のチェックを終えていることを申し添えます。			