



Title	ゲノム構造改変マウスを用いたプロトカドヘリン $\beta$ の発現メカニズムの解析
Author(s)	章, 瑠依
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/34595">https://hdl.handle.net/11094/34595</a>
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">大阪大学の博士論文について</a>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

## 〔 題 名 〕

ゲノム構造改変マウスを用いたプロトカドヘリンβの発現メカニズムの解析

学位申請者 章 瑠依

クラスター型Pcdhファミリー(Pcdh- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )に属するプロトカドヘリンβファミリー(Pcdh- $\beta$ )は、 $\beta 1$ から $\beta 22$ までの22種のアイソフォームからなる一回膜貫通型タンパク質群である。これまでの解析により、Pcdh- $\beta$ は小脳プルキンエ細胞や海馬錐体細胞において、個々の神経細胞ごとに異なる組み合わせのアイソフォームを発現していることが明らかになっている。また、ラットPcdh- $\beta 12$ は、弱いながらもホモフィリックな細胞接着活性をもつことが報告されている。Pcdh- $\gamma$ の定常領域エクソンより320 kbより下流に位置するcluster control region(CCR)が、Pcdh- $\beta$ クラスターおよび一部のPcdh- $\gamma$ のエンハンサー領域として同定されている。CCR欠損マウスにおいて、大脳皮質のバレル構造の形成が阻害されていることが明らかとなった。これらの結果より、個々の神経細胞におけるPcdh- $\beta$ の選択的な組み合わせ発現が、神経細胞の多様性を生み、脳神経系における複雑な神経回路の形成に寄与している可能性が示唆されている。しかしながら、Pcdh- $\beta$ の発現制御のメカニズムは十分に解明されていない。本研究では、Pcdh- $\beta$ の発現制御のメカニズムをより詳細に解析することを目的とした。

まずゲノム構造の変化が、マウス脳におけるPcdh- $\beta$ の発現制御にどのような影響を与えるかを解析する為に、 $\beta 1$ を欠損させ代わりに*Venus*を挿入した $\beta 3$ -K0-Vマウス、 $\beta 1$ から $\beta 22$ までを欠損させた・e1.  $\beta 3$ -22マウス、Pcdh- $\beta$ を全欠損したdel.  $\beta$ マウスを作製した。 $\beta 3$ -K0-V、del.  $\beta 3$ -22、del.  $\beta$ の各ホモマウスにおいて、WTマウスと比較して $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、*Venus*の発現量およびPcdh- $\alpha$ ファミリー、Pcdh- $\gamma$ ファミリーの全発現量をqRT-PCR法を用いて調べた結果、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、*Venus*の発現量が有意に増加していた。一方、Pcdh- $\alpha$ ファミリー、Pcdh- $\gamma$ ファミリーの発現量は変化がなかった。 $\beta 2$ ポリクローナル抗体を作製し、WT、 $\beta 3$ -K0-V、del.  $\beta 3$ -22、del.  $\beta$ の各ホモマウスの脳抽出液に対しウェスタンブロットを行った結果、WT、 $\beta 3$ -K0-Vマウスでは僅かなバンドが、del.  $\beta 3$ -22マウスでは特異的なバンドが検出されたことから、del.  $\beta 3$ -22マウスにおける $\beta 2$ の発現はタンパク質レベルでも増加していることがわかった。また、In situ hybridization法を用いて $\beta 2$ 、*Venus*の小脳、皮質、海馬における発現パターンをWT、 $\beta 3$ -K0-V、del.  $\beta 3$ -22、del.  $\beta$ の各ホモマウスにおいて調べた。その結果、WTマウスでは $\beta 2$  mRNAが、 $\beta 3$ -K0-Vマウスでは*Venus* mRNAが各領域において細胞毎に散在的に発現していることがわかった。更にWTマウスに対しdel.  $\beta 3$ -22マウスでは $\beta 2$ 発現細胞の数が増加し、 $\beta 3$ -K0-Vマウスに対しdel.  $\beta 3$ -22マウスでは*Venus*発現細胞の数が増加していることがわかった。

次にdel.  $\beta 3$ -22マウスにおいて $\beta 2$ 、*Venus*の発現量が増加したメカニズムを調べる為に、 $\beta 2$ 、*Venus*のCpGを含む共通配列(CSE)を有したプロモーター領域に着目し、 $\beta 2$ 、*Venus*の発現選択とDNAメチル化との関係性を調べた。Bisulfite Sequence法を用いてWT、 $\beta 3$ -K0-V、del.  $\beta 3$ -22の各マウスの脳抽出液に対して調べた結果、WT、del.  $\beta 3$ -22マウスにおけるCSE内のCpGは共に高頻度にメチル化されており、有意な差はなかった。また $\beta 3$ -K0-V、del.  $\beta 3$ -22マウスにおけるCSE内のCpGにおいても、共に低頻度にメチル化されており、有意な差は示さなかった。

以上のことから、Pcdh- $\beta$ の発現制御はクラスター単位で行われていること、Pcdh- $\beta$ ファミリーの多様性を変換させたマウスを用いた解析より、残ったアイソフォームの発現量および脳神経細胞において発現する数が増加したことから、Pcdh- $\beta$ の各アイソフォームの発現には、確率的な発現制御が存在することが示唆された。また、 $\beta 2$ はタンパク質として存在することがわかった。更に、 $\beta 1$ を欠損させ代わりに*Venus*を挿入した $\beta 3$ -K0-Vマウスにおいて*Venus*が $\beta 1$ 同様に細胞毎に分散的な発現パターンを示したことから、Pcdh- $\beta$ の各アイソフォームの発現には自身のタンパク質によるネガティブフィードバックが働かないこと、エクソン領域が必要ないことが明らかとなった。また、Pcdh- $\beta$ の各アイソフォームのプロモーター領域のメチル化シトシンは、アイソフォームによって異なった頻度を示し、更に $\beta 2$ の発現量が増加しているdel.  $\beta 3$ -22とWTのプロモーターのメチル化シトシンの頻度に違いが見られなかったことから、*in vivo*においては、メチル化シトシンの脱メチル化によるPcdh- $\beta$ の発現増加のメカニズムは考えにくいという結果を得た。本研究で得られたdel.  $\beta 3$ -22マウスを用いることにより、個々の神経細胞でのPcdh- $\beta$ の確率的発現制御へのアプローチが可能となると考えている。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 章 瑠 依 )			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	八木 健
	副 査	教授	山本 亘彦
	副 査	教授	村上 富士夫
	副 査	教授	仲野 徹

論文審査の結果の要旨

章瑠偉さんは、遺伝子変換マウスを作製することにより、クラスター型Pcdhファミリー (Pcdh- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) に属するプロトカドヘリン $\beta$ ファミリー (Pcdh- $\beta$ ) のゲノム構造が、マウス脳におけるPcdh- $\beta$ の発現制御、特に神経細胞における発現頻度に関わることを明らかにした。また、Bisulfite Sequence法を用いてDNAメチル化の解析を行い、Pcdh- $\alpha$ で認められているようなDNAメチル化による制御機構とは異なる機構の存在を示唆することに成功した。これらの結果は個々の神経細胞でのPcdh- $\beta$ の確率的発現制御のメカニズムを明らかにするものである。これらの新たな知見を得たことにより、博士号を受けるに値すると考える。