



Title	Analysis of gene regulation of clustered Protocadherin in a single neuron
Author(s)	河村, 佳見
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49296">https://hdl.handle.net/11094/49296</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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

氏 名	かわ 河 村 佳 見
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 1 8 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学 位 論 文 名	Analysis of gene regulation of clustered <i>Protocadherin</i> in a single neuron (単一神経細胞におけるクラスター型プロトカドヘリンの発現制御機構の解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 八 木 健 (副査) 教 授 近 藤 寿 人 教 授 村 上 富 士 夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

脳神経系は膨大な神経細胞から構成されており、個々の多様化した神経細胞が複雑な神経回路網を形成している。脳神経系で強く発現する多様化膜分子であるクラスター型プロトカドヘリン (*Pcdh*) ファミリーは、個々の神経細胞での異なる発現が明らかとなっており、タンパク質レベルでは神経軸索やシナプスに局在する。クラスター型 *Pcdh* は、ゲノム上では  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 つの遺伝子クラスターが縦列して存在する。 $\alpha$  と  $\gamma$  クラスターはそれぞれ 14 および 22 種類の可変領域エクソンと 3 つの定常領域エクソンを持ち、可変領域エクソンのうち 1 つと定常領域エクソンがスプライシングすることで成熟 mRNA となる。これまでに、可変領域エクソン  $\alpha 1 \sim \alpha 12$  は単一プルキンエ細胞において、どちらか一方の対立遺伝子に由来して発現していることが示されている。また、*Pcdh*- $\alpha$  遺伝子クラスターには  $\alpha 1 \sim \alpha 12$  エクソンとは別に  $\alpha C1$ 、 $\alpha C2$  可変領域エクソンが存在している。

本研究では単一プルキンエ細胞におけるクラスター型 *Pcdh* の発現様式を明らかにするために、今までに解析が行われていなかった *Pcdh*- $\alpha$  遺伝子クラスターに存在する  $\alpha C1$ 、 $\alpha C2$  可変領域エクソンについて解析を行った。単一プルキンエ細胞を用いた split single-cell RT-PCR 法により解析した結果、*Pcdh*- $\alpha 1 \sim \alpha 12$  可変領域エクソンが対立遺伝子ごとの独立した発現を示すのに対し、 $\alpha C1$ 、 $\alpha C2$  可変領域エクソンは、ほぼ全てのプルキンエ細胞で発現が認められ、さらにその発現は両染色体に由来していた。これらの結果から、 $\alpha 1 \sim \alpha 12$  可変領域エクソンと  $\alpha C1$ 、 $\alpha C2$  可変領域エクソンの発現制御機構が異なることが示された。また、In situ hybridization 法により、 $\alpha 1 \sim \alpha 12$  可変領域エクソンがプルキンエ細胞の一部でのみ発現が認められる一方、 $\alpha C1$ 、 $\alpha C2$  可変領域エクソンでは、ほぼ全てのプルキンエ細胞での発現が明らかとなった。このような発現制御機構は *Pcdh*- $\gamma$  遺伝子クラスターでも見受けられ、 $\gamma A$  と  $\gamma B$  タイプの可変領域エクソンは、 $\alpha 1 \sim \alpha 12$  と同様に対立遺伝子ごとに独立した発現をしており、*Pcdh*- $\gamma$  遺伝子クラスターに存在する  $\gamma C3$ 、 $\gamma C4$ 、 $\gamma C5$  は、 $\alpha C1$ 、 $\alpha C2$  と同様の発現様式を示した。

次に、 $\alpha 1 \sim \alpha 12$  と  $\alpha C1$ 、 $\alpha C2$ 、 $\gamma C3$ 、 $\gamma C4$ 、 $\gamma C5$  可変領域エクソンの発現制御機構を調べるために転写開始点を解析した。*Pcdh* の可変領域エクソン 5' 上流には種間で保存された conserved sequence element (CSE) 配列が存在し、CSE に変異を入れると転写活性が低下すること、各エクソンはこの CSE の下流から転写が始まることより、この配列がプロモーター領域になっていることが示唆されている。本研究において C-type 可変領域エクソンの転写

開始点を解析した結果、 $\alpha C2$ 、 $\gamma C4$ はCSE上流にも転写開始点が存在し、 $\alpha 1 \sim \alpha 12$ 、 $\gamma A$ 、 $B$ とは異なるプロモーター領域が示された。また、 $\alpha C2$ 上流領域を用いてプロモーターアッセイを行ったところ、少なくとも2つのプロモーター領域が存在することが示唆された。また、Venusを用いたトランスジェニックマウスを作製した結果、全ての系統において下オリーブ核でのVenusの発現が認められた。5系統中3系統においてプルキンエ細胞でのVenusの発現が認められ、うち2系統ではほぼ全てのプルキンエ細胞がVenusを発現した。このことからプロモーターを含む上流領域が、 $\alpha C2$ の下オリーブ核、プルキンエ細胞における発現に寄与している可能性が示唆された。しかし、嗅球、大脳皮質は内在性の $\alpha C2$ が発現しているにも関わらず全トランスジェニックマウス系統でVenusの発現が認められなかった。

本研究から、*Pcdh*- $\alpha$ には単一神経細胞ごとに差次的な発現をする可変領域エクソンと全ての細胞で発現する可変領域エクソンが存在すること、これらが別々のプロモーター活性をもつことが明らかとなった。また、 $\alpha C2$ の下オリーブ核、プルキンエ細胞における発現制御には、プロモーターを含む上流領域が寄与している可能性が示唆されたが、脳全体の発現制御には上流領域だけでなく組織特異的なエンハンサーやサイレンサーなどの調節領域が必要であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

クラスター型プロトカドヘリンは脳神経系で発現する多様化した分子群であり、可変領域エクソンと定常領域エクソンを持つ遺伝子クラスター構造をもつ。申請者は、個々のプルキンエ細胞を単離し、単一細胞におけるプロトカドヘリン $\alpha$ 遺伝子の発現を解析した。その結果、クラスター型プロトカドヘリン $\alpha$ には、個々のプルキンエ細胞において異なる発現をもつ可変領域エクソンと、ほとんど全てのプルキンエ細胞で発現している可変領域エクソン（Cタイプ）があることを明らかにした。申請者は次に、Cタイプ可変領域エクソンの発現制御を明らかにする為に、転写開始点を詳細に解析した。その結果、C2以外の可変領域エクソンではプロモーター領域にあるCSE（conserved element）配列の下流から転写が開始されるのに対し、 $\alpha C2$ 及び $\gamma C4$ 可変領域エクソンでは転写開始点が広く存在し、CSE上流にも多数の転写開始点があることを明らかにした。申請者はさらに、プロトカドヘリン $\alpha C2$ の転写開始点を含む5'上流領域2 kbを用いてトランスジェニックマウスを作製し、この領域がプルキンエ細胞、下オリーブ核における遺伝子発現に関わる可能性を示唆した。しかし、大脳皮質、嗅球、視床などでは活性が認められず、この遺伝子領域だけではなく、他の遺伝子制御領域の存在の可能性を示唆した。

このように、申請者はクラスター型プロトカドヘリンの可変領域エクソンの遺伝子発現制御の解析により、上述した成果を得た。よって、本研究は学位に値するものとする。