



Title	TOTAL EXPRESSION AND DUAL GENE-REGULATORY MECHANISMS MAINTAINED IN DELETIONS AND DUPLICATIONS OF THE PROTOCADHERIN-ALPHA CLUSTER
Author(s)	野口, 由紀子
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54137
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、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

氏名	野口由紀子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第23430号
学位授与年月日	平成21年11月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	TOTAL EXPRESSION AND DUAL GENE-REGULATORY MECHANISMS MAINTAINED IN DELETIONS AND DUPLICATIONS OF THE PROTOCADHERIN-ALPHA CLUSTER (プロトカドヘリンα遺伝子クラスター構造改変マウスにおいて、発現の全量と二重の遺伝子制御機構が維持されていた。)
論文審査委員	(主査) 教授 八木 健 (副査) 教授 近藤 寿人 教授 濱田 博司

論文内容の要旨

[目的]

脳は、多様な神経細胞の集団で、それらは複雑な神経回路を形成している。しかし、その多様な神経細胞の個性を生み出すメカニズムについてはよくわかっていない。神経細胞に多様性を付与する候補遺伝子の一つとして、*Protocadherin-α (Pcdha)*遺伝子クラスターが考えられる。*Pcdha*遺伝子クラスターは、14種類の膜貫通型タンパク質をコードしており、それらは解剖学的に同一に分類される神経細胞(小脳ブルキンエ細胞)で、神経細胞毎に異なる組み合わせで発現している。*Pcdha*タンパク質は膜タンパク質であるので、この*Pcdha*のアイソフォームの発現の差異が神経細胞同士の認識に使われ、神経回路形成に関与していると推測される。*Pcdha*遺伝子改変マウスは、神経細胞の軸索投射や学習・記憶において異常を示すことも報告されている。

14種類の遺伝子からなるマウス*Pcdha*遺伝子は、第1エクソン(可変領域エクソン)が一列に並んでおり(5'側から3'側に向かって $a1-a12$ 、 acl 、 $ac2$)、それらは個別のプロモーター配列をもつ。一方、その下流にある第2-4エクソン(定常領域エクソン)は、これらの遺伝子で共通のエクソンとなっている。個々のブルキンエ細胞は、5'側に位置する*Pcdha1-a12*の中から1-2個を発現し(ランダム発現)、3'側に位置する*Pcdha1*と*c2*は、恒常的に発現している(恒常的発現)。この発現パターンは、2種類の発現制御の存在の可能性を示している。しかし、この二重の発現制御機構についてはよくわかっていない。本研究では、ゲノム構造とこの発現制御機構との関係性について調べた。

[方法ならびに成績]

第1エクソンの数を改変するために、遺伝子ターゲティング法と標的の減数分裂期での $Cre/loxP$ 組換え法を用いて、 $a11-ac2$ エクソン欠損マウスと $a2-a11$ エクソン欠損マウス、 $a2-a10$ エクソン重複マウス、 $a12-ac2$ エクソン重複マウスを得た。

最初に、定量的RT-PCR法を用いて、4種類のマウスにおける*Pcdha*の発現量の解析を行った。全てのアイソ

フォームに共通の定常領域エクソンの発現量、つまり*Pcdha*遺伝子の全体の発現量が、各遺伝子改変マウスにおいて、保存されていた。また、各遺伝子改変マウスにおいて、個々の*Pcdha*アイソフォームの発現量を調べた。 $a11-ac2$ エクソン欠損マウスと $a2-a11$ エクソン欠損マウスでは、欠損した遺伝子の発現は、残りの遺伝子によって補われていた。一方、 $a2-a10$ エクソン重複マウス、 $a12-ac2$ エクソン重複マウスにおいて、遺伝子の数が2倍になった遺伝子の発現量は、2倍に増加することではなく、1倍前後であった。

発現パターンを確認するために、*in situ*ハイブリダイゼーション法を行った。4種類のマウスすべてにおいて、第一エクソンの欠損・重複に関わらず、5'側の遺伝子はランダムな発現パターンを、3'側の遺伝子は恒常的な発現パターンを示した。これらの結果は、第一エクソン数を改変させたマウスにおいても、ランダムと恒常的な発現に対する二重の発現制御が、第1エクソンの位置(個々のプロモーターの相対的位置)に依存して維持されていたことを示した。

個々のブルキンエ細胞での*Pcdha*遺伝子の発現パターンを詳細に調べるために、Single-cell RT-PCR/SNP解析法(単一細胞において、父方と母方由来のアレルの遺伝子発現を区別できる解析方法)を行った。ヘテロマウスの解析から、変異型アレルの*Pcdha*遺伝子の発現は、野生型アレルからの*Pcdha*の発現には影響せず、*Pcdha*遺伝子はアレル毎に独立に発現が制御されている事が示された。

[総括]

以上の結果から、*Pcdha*クラスターには二重の遺伝子制御が存在し、その発現制御領域は第一エクソン領域の外に存在することが示された。実際に、3'下流にエンハンサー領域が見つかっており、このエンハンサーとの位置効果やプロモーターの選択性が二重の発現パターンを生み出しているのではないかと考えられる。*Pcdha*遺伝子の中で、ランダムな発現をする遺伝子と恒常的な発現をする遺伝子は、発現パターンが異なるだけでなく、そのタンパク質のアミノ酸配列の相同性からも同様に2つに分けることができる。ゆえに、この*Pcdha*クラスターに対する二重の遺伝子制御は、14種類の*Pcdha*に機能的に2つに分けるために必要な制御機構であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

脳は、個々の細胞が個性をもつ神経細胞からなる複雑なシステムである。しかし、神経細胞の個性をもたらすメカニズムについては殆ど明らかにされていない。*Protocadherin-α (Pcdha)*ファミリーは、遺伝子クラスターを構成している多様化膜分子群であり、これまでに個々の神経細胞(小脳ブルキンエ細胞)ごとに異なる発現が明らかになっている。本論文では、この*Pcdha*遺伝子クラスター構造と遺伝子発現制御との関係を解析し、新たな知見が得られている。*Pcdha*遺伝子クラスターは、可変領域において14個の第1エクソン($a1-a12$ 、 $ac1$ 、 $ac2$)が継列しており、それぞれにあるプロモーターが選択されることにより異なるアイソフォームを発現することが明らかになっている。本研究では、この可変領域の第1エクソンの数を変化させた遺伝子変換マウスを作製することにより、ゲノム構造と遺伝子発現制御との関係性について調べた。その結果、*Pcdha*遺伝子クラスターに存在する2種類の遺伝子制御(ランダムな発現と恒常的発現)、*Pcdha*アイソフォームの総発現量は、可変領域エクソンの数を変化させても維持されていることが明らかになった。また、遺伝子クラスターの最も3'に存在する可変領域エクソンが定常的発現になると、可変領域エクソンの数に依存してランダムな発現頻度が変化することが新たに明らかとなった。これらの知見は、個々の神経細胞において異なる遺伝子発現をもたらす新たな遺伝子制御機構を示唆するものであり、博士(医学)の学位授与に値する。