

OLプロトカドヘリン (プロトカドヘリンQ) のシナプス 局在とアイソフォームの役割

Localization of OL-protocadherin (protocadherin Q) and differential role of its isoforms

研究代表者

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 研究員 平野伸二
Research Associate, Institute for Developmental Research
Aichi Human Service Center, Shinji HIRANO

I characterized OL-protocadherin and examined its expression pattern in the developing mouse brain. The OL-protocadherin expression seemed to be restricted to a subset of functionally related brain nuclei and regions such as the nuclei in the main olfactory system, the limbic system, and the olivo-cortical projection. This is the first comprehensive description of the expression of a protocadherin in the central nervous system. I also cloned a new member of the protocadherin 2 subfamily and named it protocadherin 2C. The expression pattern was quite similar to that of OL-protocadherin although the timing and relative strength of expression were different. These results suggest that OL-protocadherin may be involved in neural development along with other classes of protocadherins.

1. 研究目的

神経系の形成には細胞間相互作用が重要な役割を果たしている。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間接着分子であり、特に中枢神経系で特異的に発現しているものが多い。しかも、その種類は百以上あると考えられ、それらは染色体上で一大遺伝子群を形成していることがわかってきている。従ってプロトカドヘリンは神経系での細胞の分化や認識などの神経回路における多様性を生み出すのに寄与していることが予想される。私はこれまでに、マウスにおいてOLブ

ロトカドヘリン(注:プロトカドヘリンQを改称)と名付けた新しいタイプのプロトカドヘリンを発見した。本研究ではOLプロトカドヘリンが神経系形成に果たす役割を明らかにすることを目的にして、その発現を調べ、オールタナティブスプライシング産物の解析を行った。さらに、プロトカドヘリン2cという新しいプロトカドヘリンとの発現の比較を行った。

2. 研究経過

2.1. 方法

cDNAクローニングは、通常の方法に従った。マウスおよびニワトリ成体脳のcDNA

ライブラリーを、ランダムプライマーで合成したプローブを用いて、スクリーニングした。発現の解析は、Wilkinson の in situ ハイブリダイゼーションの方法を用いた。モノクローナル抗体の作製は Kohler & Milstein の方法に従った。アイソフォームに特異的な C 末端部分と GST 融合タンパクを抗原とし、ラットに免疫した。

2.2. 結果および考察

OL プロトカドヘリンの発現パターンの解析

これまでにクローニングをした OL プロトカドヘリンの発現パターンを調べた。嗅覚系や大脳辺縁系のいくつかの神経核や小脳皮質にストライプ状の発現が見られ、これらの神経系の形成に OL プロトカドヘリンが関与していることが示唆された。モノクローナル抗体を用いてタンパクの分布を調べてみると、小脳の発生過程でプルキンエ細胞とクライミングファイバーがシナプスを形成する時期にプルキンエ細胞にタンパクの分布が見られた。また、嗅球のグロメルラスの部分に濃縮がみられた。これらのことは、OL プロトカドヘリンがシナプス形成に関与することを示唆するものである。

また、OL プロトカドヘリンの染色体マッピングを行ったところ、3b にあることが明らかになった。これは、これまで報告されている他のプロトカドヘリンの遺伝子クラスター (18c) とは異なる部位にあり、OL プロトカドヘリン遺伝子が独立して存在することが明らかになった。

プロトカドヘリン 2C のクローニングおよび発現の解析

マウス OL プロトカドヘリンのクローニングの過程で、プロトカドヘリン 2A に似たクローンを得た。そこで、その全長の塩基配列を決定した。すると、プロトカドヘリン 2A に似ているが、別の分子であることが明らかになり、プロトカドヘリン 2C と命名した (図 1)。その発現を in situ ハイブリダイゼーションで調べると、発現の時期や強度が異なっているものの、全体としては OL プロトカドヘリンの発現と非常に良く似ていることが明らかになった。特に、小脳の縞状の発現などは特徴的であった。神経系内では、異なるプロトカドヘリンがお互いにオーバーラップして発現していることがわかった。それらのプロトカドヘリンの役割が、リダundantなものか独立したものかは、今後の課題である。

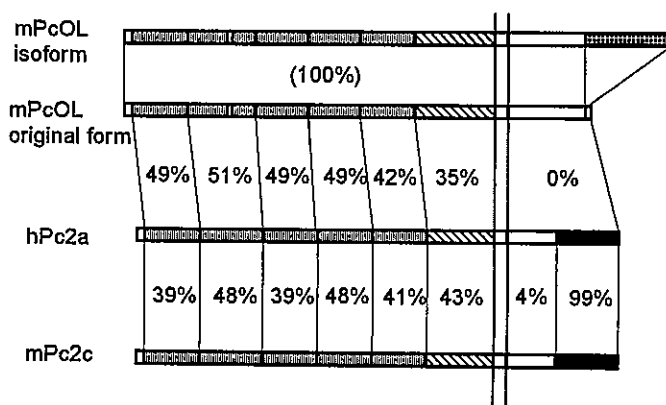


図 1 マウス OL プロトカドヘリンとプロトカドヘリン 2C の構造

OL プロトカドヘリンには細胞内領域長さの異なるアイソフォームが存在する。OL プロトカドヘリンの細胞外領域はプロトカドヘリン 2 ファミリーと相同性があるが、細胞内領域は全く異なる。プロトカドヘリン 2c はプロトカドヘリン 2 ファミリーの特徴を有している。

OLプロトカドヘリンのアイソフォームのクローニングと特異的抗体の作製

まず、マウスについてアイソフォームのクローニングを行った。全長のクローニングに成功したが、シークエンスは、現在進行中である。ニワトリについてもアイソフォームのクローニングを進めており、一部を除いてクローニングは終わった。マウス、ニワトリのアイソフォームの細胞内領域の塩基配列を決定したところ、アルカドリンやプロトカドヘリン1と共通するモチーフが見つかった(図2)。これまで、これらのプロトカドヘリンの細胞内領域には相同性は全く見つかっていなかったため、今後の機能解析に役立つ情報となると考えられる。

つぎに、アイソフォームの分布を調べるために、アイソフォームに特徴的な配列部分のモノクローナル抗体(5G10)を作製した。この抗体とアイソフォームとオリジナルフォームを両方認識する抗体(2H8)を用いてそれぞれのフォームの分布の違いを調べた。すると、成体の脳では、扁桃体では主にオリジナルフォームが分布しているが、視床などでは主にアイソフォームが分布していることが明らかになった(図3)。また、アイソフォームをマウス

線維芽細胞に導入して、タンパクの局在を調べた。すると、オリジナルフォームと同様細胞接着面に局在することがわかった。このことは、細胞内領域の違いは、トランスフェクタントでの局在とは関係ないことを意味している。

3. 研究成果

新しく発見したOLプロトカドヘリンの発現を記述し、OLプロトカドヘリンが神経回路形成に関与する可能性を示した。また、その発現は、別のタイプのプロトカドヘリンであるプロトカドヘリン2cと酷似していることを明らかにした。

4. 今後の課題と発展

予定が全体的に遅れたので、ニワトリとマウスのアイソフォームのクローニングおよびシークエンスが現在進行中である。ニワトリのクローンを用いて、よりアフィニティの高い抗体を作り、シナプスでの局在を検討したいと考えている。現在、アイソフォームの役割を明らかにするためにドイツのグループと共同研究を開始し、ストリオソームと小脳で他のカドヘリンとの関連を検討している。

```
mALT..QEADOVSSLDSEJGDSQDSDJDVNTNRGQSAGMDLFSNCTEECKALGHSDRCWMPSPVPSDGRQAADYRSNLHVPGMDS
Hyp..SEAGDSYDLGRDSDPRLLEGEGFSDLFLTDGRIEPAAMRLCTEECRVLGHSDQCWMPPLPS---PSSDYRSNMFIPEGEEF
Arc..EKFSKDSGSDSDFNDSDSISGDALKKDLINHMQSGLWACTAECKILGHSDRCWSPSCAGPNTHPPHPPAQMSTFCKST
PC1..GFLALPEDHYERTTPDGSIEMEHPENDLRPLPDVAMTGTCTRECSEFGHSDTCWMPGQSSPSSRRKSSALKLSTFMPYQDR
BH...SSSGPRLGALPLPEDNYERTTPDGSVDSRPLPDVALTGKCTRECDEYGHSDSCWMPVTRTSPERKKSQPKLSTFMPVDERGS
```

```
mALT..VPDTEVFEP-----PEVQPGAERSFSTFGKEKALHGTLEKELDGLLSNTRAPYKPPYLTRKRIC
Hyp..PTQPQQHPHQSLEDDAQPADSSEKKSFSSTFGKDSFNDEDTGDTSTSSLLSEMSSVQQRLLPPLDLYSECSEVDRSNSLERRK
Arc..SLPRDPLRRDNYAQAQLPKTVGLQSVYEKVLHRDYDRTVTLLSPPRPGRLPDLQEI GVPLYESPPGGRYVSPKKTENNV
PC1..GGQEPAGAGSPSPEDRNTKTA PVRLPSYSASFSSSHSDCKDSATLEIPLTQTSDFPFAATPASAQTAKREIYL
BH...QEKLANGEAAIMGDRNRNLLNKKLTSSYETFSAASFKNNEANPDIPLTKTEYKPSPVNTLTRREYVL
```

図2 プロトカドヘリンで保存されているモチーフ

mALT: OLプロトカドヘリン、Hyp: ヒト未知のプロトカドヘリン、Arc: アルカドリン、PC1: プロトカドヘリン1、BH: BHプロトカドヘリン

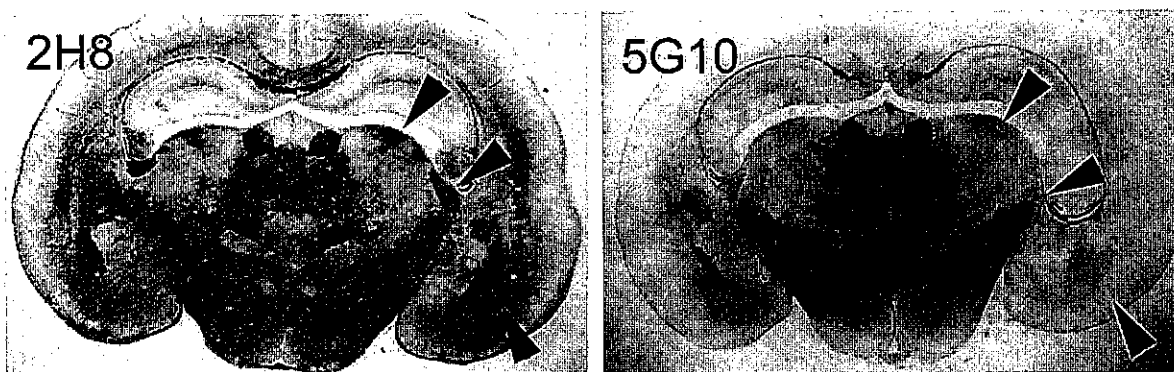


図3 OLプロトカドヘリンのアイソフォームの分布

2H8 : オリジナルフォームとアイソフォームの両方を認識
 5G10 : アイソフォームのみ認識。 (C.Redies & S.Hirano, unpublished)

5. 発表論文リスト

- 1 Hirano, S., Yan, Q., Suzuki, S.T.: Expression of a novel protocadherin (OL-protocadherin) in a subset of functional systems of the developing mouse brain. *J. Neurosci.* 19: 995-1005, 1999.
- 2 Hirano, S., Ono, T., Yan, Q., Wang, X., Sonta, S., and Suzuki, S.T. Protocadherin 2C: A new member of the protocadherin 2 subfamily expressed in a redundant manner with OL-protocadherin in the developing brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 260, 641-645, 1999
- 3 Usui, T., Shima, Y., Shimada, Y., Hirano, S., Burgess, R.W., Schwarz, T. L., Takeichi, M., and Uemura, T. Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates epithelial planar polarity under the control of frizzled. *Cell* 98, 585-595, 1999
- 4 Ono, T., Hirano, S., Yonezawa, S., Aono, S., Osaki, M., Masaki, S., Yamashita, S., Tsukasaki, T., Oohira, A., Suzuki, S.T., and Sonta, S. Comparative mapping of 7 genes among mouse, rat and Chinese hamster chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 印刷中
- 5 Kitagawa, M., Natori, M., Murase, S., Hirano, S., Taketani, S., and Suzuki, S.T. Mutation analysis of cadherin-4 amino acid residues of EC1 important for the structure and function. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 印刷中