

中枢神経ゲノムでのCNR分子の体細胞レトロトランスポジションの解析と生成機構の解明

●杉野英彦

大阪大学大学院生命機能研究科

＜研究の目的と進め方＞

CNR分子ファミリーは脳内で多く発現しているカドヘリン型接着分子ファミリーの一つである。cDNA解析の結果、CNR分子は全部で16個あることが分かった。CNR分子は大脳皮質神経細胞のシナプスで発現していること、各神経細胞で複数のCNRが異なったコンビネーションで発現していること、またカドヘリンスーパーファミリー群の1つなので、ホモフィリックな結合が予想されること等から、複雑な脳神経回路網の形成やその後の可塑性維持に重要な役割を果たしているものと考えられる。ゲノム構造の解析の結果、16個のCNR分子はそれぞれが異なった細胞外ドメインを持ち、これらをコードする領域は異なるエクソンとして存在する（染色体上で縦列に並んでいる）。一方膜貫通領域から細胞内ドメインをコードする領域は16個のすべてのCNR分子で共通のものが使われている（染色体上では1ヶ所しか存在していない）。すなわち「可変領域」としての第1エクソンと、「定常領域」としての第2～4エクソンが繋ぎ変わることで、16種類の分子種を作り出していると考えられた。このような繋ぎ換え（組替え）が起こっているとすると、免疫系のイムグロブリンのクラススイッチと酷似しており、免疫系のイムグロブリン以外では初めての知見である。そこでの染色体上でのCNR分子の組替え体の検索と解析を行い、脳における接着分子群の多様性獲得のメカニズムを明らかにする。

＜研究開始時の研究計画＞

マウスの14個の可変領域エクソン内の共通配列と、全てのCNRが共有する定常領域エクソン内の配列をプライマーとして、ゲノミックPCRを行うと、ゲノム上では最短のものでも、100KB以上離れているので、組み換え体CNRしか増幅されないと予想される。そこでマウス脳由来のゲノミックDNAに対してゲノミックPCRを行い、そのPCR産物を解析する。さらに脳由来のゲノミックライブラリーを構築し、定常領域エクソンをプローブでスクリーニングするとことにより、組み換え体CNRゲノム分子を得て、その詳細な構造、メカニズムを解明する。

＜研究期間の成果＞

2001年度

14個の可変領域エクソン内の共通配列と、全てのCNRが共有する定常領域エクソン内の配列をプライマーとして、ゲノミックPCRを行ったところ、およそ1.2KbのPCR産物が得られた。これをクローニング・シーケンス解析したところ、可変領域エクソンと、3個の定常領域エクソンがきれいにスプライシングしている、cDNAと酷似した配列であることが分かった。また可変領域エクソンは、すべてのCNR分子種を有していた。次に、組み換えがどのようなメカニズムで行われたかを明らかにするために、その周辺配列、明らかにすることにした。方法は、脳組織、特にCNRを高発現している、嗅球、大脳皮質、海馬、小脳からゲノ

ミックDNAを抽出し、 λ ファージのゲノミックライブラリーを構築しスクリーニングを行う。脳組織における神経細胞の存在頻度、さらにはその中でCNRの発現頻度を考慮すると、高密度のゲノミックライブラリーが必要とされる。そこで30ゲノム相当(1.0 X 10⁷ pfu)、すなわち通常の10倍の密度のゲノミックライブラリーを構築し、同数のスクリーニングを行った。その結果、11個のCNRのゲノミッククローンが得られた。そのうちの2個は定常領域エクソンCP3周辺のものであり、残りの1個も定常領域エクソンCP1、CP2周辺を含む、非組み換え体であった。残りの1個はCNRv6と3個の可変領域エクソンが連結している、組み換え体ゲノミッククローンであった。興味深いことにこのクローンは通常のCNR領域（マウス染色体12番 長腕21）に存在するものではなく、マウスのゲノム上の数多く存在する、リボゾーマル遺伝子の28Sの5'側からおよそ200bp下流に、CNRv6のcDNAが逆転写再挿入される構造体であった。このクローンは、一度転写されたCNRが逆転写され、その後、リボゾーマル遺伝子の28S中に再挿入されたことを強く示唆する。

こうした現象は生殖細胞中で極めて低頻度ながら生成されてきたシュードジーンと酷似している。体細胞でのこうした現象は初めてのものである。

2002年度

次に、このようなイントロンを欠くCNR（イントロンレスCNR）が、全てのマウスの脳の、全ての領域で普遍的に存在するか否かを27匹のマウス（P1から8 month）を用いて、検討した。27匹のマウス全てから、嗅球、大脳皮質、海馬、小脳を個々分離し、前述のゲノミックPCRを行ったところ、27匹中9匹のマウスでイントロンレスCNRが出現した。週齢による差はなかった（P1:3, P10:1, 4week:1, 10week:2, 3month:1, 8month:1）。一方、脳の各領域では小脳領域が最も多く（7個体）、次いで海馬（6個体）、嗅球（3個体）、大脳皮質（2個体）の順であった。これはCNRの発現頻度の順と一致する。これらのことより、イントロンレスCNRは全ての個体で出現するのではなく、出現領域も個体によりまちまちであるがCNRの発現している領域との間に相関関係があることが明らかした。これらのイントロンレスCNRが機能しているのか否かを検討するために、リボゾーマル遺伝子28S中に挿入されていた、イントロンレスCNRv6（プロモーター領域も含むがpolyAシグナルは持たない）のトランスジェニックマウスを作製したがその発現（mRNA、蛋白質）は見出されなかった（未発表データ）。2002年度は同時にラットCNRのゲノムの全塩基配列の決定を行った。ラットでは、マウスのようなイントロンレスCNRは出現しなかった。ラットCNRはマウス、ヒトと高い相同性を示し、特にマウスとの間では平均95%（アミノ酸）と高い相同性を示した。興味深いことに、可変領域エクソンは94.8%だが、定常領域エクソンは99%と高い相同性を示した。ラット/ヒト間でも、可変領域エクソ

ンは82%だが定常領域エキソンでは98%と高い相同性を示した。また最も長いものはマウスであり250Kb、次いでラット(240Kb)、そしてヒト(230Kb)であった。マウスの場合CNRv12とCNRc01の間に、完全なORFを有するLINE-1レトロトランスポソンの挿入が見られ、それが原因である。ラットマウスでも多くのLINE-1の挿入が見られるが、intactなLINE-1の挿入はマウスのみである。マウスゲノム中には、多種多数のLINE-1が存在するが、マウスCNRゲノムで見出されたLINE-1は其中でも、ごく最近になり増加し始め、逆転写・再挿入活性の最も強い一つとされるL1Md-Tf型であった。

2003年度

2002年度までに、全てのマウスの全て脳領域においてではないが、イントロンレスCNRが出現することを明らかにした。しかしその後、ゲノミックライブラリーのスクリーニングを重ねても、ゲノム中に挿入されたイントロンレスCNRは見出されなかった。そこでイントロンレスCNRのすべてが、ゲノム中に挿入されているのか、あるいは別の構造体として存在しているのか否かを検討した。核内には多くの環状DNAが存在することが知られている。そこでイントロンレスCNRも、環状構造として存在すると予想し研究を進めた。マウス全脳から抽出したゲノミックDNAを10—38%のシェーククロスの密度遠心勾配に供し、DNAのサイズごとに15画分に分集した。これらの画分に対してまず通常のゲノミックPCR(14個の変領域エキソン内の共通配列(正方向)と、全てのCNRが共有する定常領域エキソン内の配列(逆方向))を行ったところ、ゲノムDNA(>100KB)を最も多く含む画分と、ゲノムDNAを含まない画分(でPCR産物(1.2Kb)が見出された。シーケンス解析の結果、いずれもイントロンレスCNRであった。次ぎにそれぞれのプライマーの逆配列を用い、inverse PCRを各画分に対して行ったところ、ゲノムDNAを含まない画分でのみ3.1KbのPCR産物が見出された。これらをシーケンス解析した結果、予想通り環状構造を形成しているイントロンレスCNRであることが明らかにされた。興味深いことに環状化する連結ヶ所の配列はいずれも(CA)_nリピートであった。このリピート配列は、マウスCNRのUTR中に数多く存在する。このため一度転写され、逆転写されたCNRはこの配列を介し、(CA)_nリピート同士で相同組み換えを起こし環状化するものと予想される。現在までにマウス脳神経細胞で、XRCC2, XRCC3, Rad51c, Rad52dの4つの相同組み換え酵素が見出されていることが、この考えを強く支える。以上の結果、イントロンレスCNRはほとんどが環状構造をとり、その中の一部がゲノム本体に挿入するものと予想される。2003年度は同時にニワトリCNRの全ゲノム配列の決定とその解析を行った。ニワトリもラットと同様、イントロンレスCNRは出現しなかった。ニワトリCNRの特徴は、

1) 可変領域エキソンはマウス、ヒトと比べ相同性が低い(53%)。一方、定常領域エキソンは高い(90%)。

2) 可変領域エキソンはCG含有量が極めて高く(Obs/Exp; 1.9)、哺乳類の2倍近い。また、各可変領域エキソン間の相同性は92%と高く(マウス;77%, ヒト;73%)、高いCG含有率から来るstop codon出現頻度の低下のため、各エキソンはそれぞれ正方向に2種、逆方向に2種の合計4種の1Kb以上のORFをコードしている。

3) 哺乳類のCNRゲノム領域の約70%はLINE-1レトロトランスポソンによって占められているが、ニワ

トリのCNRゲノム領域にレトロトランスポソンは全く存在しない。さらに他のリピート配列も極めて少ない(15%以下)であった。

2004年度

最後にイントロンレスCNR生成、すなわちCNRの逆転写・再挿入に関わる原因遺伝子をLINE-1の持つ逆転写酵素、インテグラーゼと考え、その脳における発現を検討した。前述の様にマウスLINE-1は種々のサブタイプが存在するので、それらの中から代表的な4個のサブタイプ(L1Md-V, L1Md-F, L1Md-A, L1Md-Tf型)に着目して、共通のプライマーを設計し、脳4領域(嗅球、大脳皮質、海馬、小脳)、肺、心臓、肝臓、腎臓でRT-PCRを行うと、脳4領域で他の組織よりも強い発現が見られた。更にノーザンブロットでも同様の結果が得られた。RT-PCR産物の60個をシーケンス解析した結果、Tf型が34個でありその中で33個がORFを保持していた。次いでA型が13個であり、これも12個がORFを保持していた。Tf型とA型はいずれもマウスの進化の過程で最近になり出現したものであり、とくにTf型は自らの転写・逆転写・再挿入(レトロトランスポジション)する能力が高いとされているものである。さらに詳細の発現頻度を調べるために、脳組織由来のcDNAライブラリーをTf型とA型の共通配列でスクリーニングしたところ、脳組織での全転写産物のうち2000個に1個がLINE-1ポジティブであった。こちらの中からランダムに12クローンを選び、全塩基配列を決定したところ、10クローンが全長鎖のLINE-1であり、5クローンはORFを保持していた。この5クローンはいずれもTf型であった。この結果はRT-PCRの結果に準ずるものである。最後にin-situハイブリダイゼーションを行った。その結果、P4 weekのマウス脳では嗅球、大脳皮質(2~3層、海馬(CA1~3, DG)、小脳顆粒細胞にて強い発現を見出した。これらの発現領域は、CNRと酷似しており、イントロンレスCNR生成の原因遺伝子がLINE-1であり、その中でもL1Md-Tf型である可能性が高いことを明らかにした。

〈国内外での成果の位置づけ〉

脳神経細胞での特定遺伝子の転写・逆転写再挿入(レトロトランスポジション)を見出したのは、内外共に初めてのことである。また脳神経細胞でのLINE-1の発現の詳細な解析(サブタイプ、頻度、発現場所)も初めてのことである。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

イントロンレスCNR(環状、ゲノム挿入体)の機能についての解明。前述のように、28Sリボソーム遺伝子中に挿入されたイントロンレスCNRv6は、発現しなかったが、まだ多数のイントロンレスCNRが存在しており、その生体での機能の解明、解釈がほとんど出来なかった。現在のデータからは、「LINE-1の脳での強い発現による副産物」としか言及できない。予想外の困難はLINE-1の発現を検討する際のゲノムDNAの混入である。LINE-1はマウスゲノム中に全長鎖のものでも数千コピー存在する。さらにLINE-1はイントロンを含まないので、RT-PCR、ノーザンブロット、in-situハイブリダイゼーションを行う際必ず、バックグラウンドとして、ゲノム由来のものが混入する。そのため、徹底したDNAase処理、sense, anti-sense鎖との比較に時間を費やした。最終的には、cDNAライブラリーのスクリーニングとそこから得られたクローンのシーケンス解析の結果が、LINE-1の脳神経細胞で

の高発現を強く支持するデータとなった。

〈今後の課題〉

今回のイントロンレスCNRの原因遺伝子と予想されたLINE-1が脳神経細胞での高発現していることを見出した。そこでLINE-1の脳神経細胞での機能の解明が待たれる。最近になり、培養細胞の系で強制発現させたLINE-1は、再度ゲノムに逆転写再挿入することで宿主ゲノムの大規模な欠失、転座、逆位といった再編成を引き起こすことが報告された(Cell,2002,110,277-280)。2005年には、ヒト活性型 LINE-1のレトロトランスポジションが、神経前駆細胞の分化に関わっている可能性を示唆する論文が発表された(Nature,2005,435,903-910,.)。この論文では、LINE-1のトランスジェニックマウスは、中枢神経細胞でのみ、低頻度ではあるがレトロトランスポジションすると報告されている。これらの報告と我々の実験結果を重ね合わせて考えると、LINE-1による、嗅球、大脳皮質2〜3層、海馬、小脳顆粒細胞での神経細胞ゲノムの大規模な再編成の可能性が強く予想される。こうした再編成が行われているのなら、どのような役割(遺伝子の発現変化、ゲノムの修復等)に関わっているのか明らかにされることが待たれる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0111090913
Takei,Y., Hamada,S., Senzaki,K., Mutoh,T., Sugino.H., and Yagi,T., Two novel CNR gene cluster have molecular features distinct from those of CNR1 to CNR8, Genomics, 72, 321-330 (2001)
2. 0202051906
Yamazaki,Y., Makino, H., Hamaguchi-Hamada, K., Hamada, S., Sugino, H., Kawase, E., Miyata, T., Ogawa, M., Yanagimachi, R., and Yagi, T., Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 98(24),14022-14026 (2001)
3. 0303071754
Yagi,T., Tada.M., Tanaka.Y., Senzaki.K., Hirayama.T., Hamada.S and Sugino. H., Diversity of cadherin-related neuronal receptor family in the nervous system International Congress Series, 1246, 127-136, (2002)
4. 0310171017
Yanase, H., Sugino, H., and Yagi, T., Genomic sequence and organization of the family of CNR /Pcdha genes in Rat, Genomics, 83, 717-726 (2004)
5. 0312090803
Sugino, H., Miyazaki, M., and Yagi, T., Biochemical and Biophysical Research Communications, 313, 775-783 (2004)
6. 0402240814
Sugino, H., Yanase, H., Hamada, S., Kurokawa, K., Asakawa, S., Shimizu, N., and Yagi, T., Biochemical and Biophysical Research Communications, 316, 437-445 (2004)
7. 0407261219
Tada,M., Senzaki,K., Tai,Y., Morishita,H., Ishi,Y., Asakawa,S., Shimizu, N., Sugino,H and Yagi,T., Genomic organization and transcripts of the zebrafish Protocadherin genes, GENE, 13,340, 197-211 (2004)
8. 0407261236

Sugino,H., Toyama,T., Taguchi, Y., Esumi, S., Miyazaki, M and Yagi,T., Negative and positive effects of an IAP-LTR on nearby Pcdha gene expression in the central nervous system and neuroblastoma cell lines, GENE, 4, 337, 91-10 (2004)