

氏 名 平 山 晃 斉

学位 (専攻分野) 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第619号

学位授与の日付 平成14年3月22日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Somatic Mutations of Synaptic Cadherin (CNR family)  
Transcripts in the Nervous System

論文審査委員	主 査 教授	森 泰生
	教授	永山 國昭
	教授	池中 一裕
	教授	八木 健 (大阪大学)
	教授	花岡 文雄 (大阪大学)

## 論文内容の要旨

中枢神経系と免疫系はともに、未知の環境に対して柔軟に対応できるという点で類似している。しかし、それを担う遺伝子の数には限りがある。これらを可能にする免疫系の分子メカニズムとしては、免疫グロブリンや T 細胞受容体をコードする遺伝子の体細胞における再構成や免疫グロブリンにおける体細胞突然変異が知られている。また、抗原に対してより親和性の高い細胞が選択されることが知られている。一方、中枢神経系の機能には、複雑なネットワークをつくる多様な神経細胞と可塑的な変化が重要な役割を担うと考えられるが、中枢神経系の多様性をもたらす分子メカニズムは明らかとはいえない。

近年、チロシンリン酸化酵素である Fyn と結合する分子として同定された多様化した CNR ファミリーはシナプスに局在するカドヘリン様の接着分子ある。CNR ファミリーは遺伝子構造の解析から可変領域と定常領域とからなり、免疫グロブリンや T 細胞受容体の遺伝子構造と似ていることが明らかとなった。彼は、シナプスに発現する CNR ファミリー遺伝子の発現メカニズムに免疫系類似の体細胞における変化があるか否かについて中枢神経系の発生にしたいが検討した。はじめに CNR ファミリー遺伝子の発現メカニズムを解析する目的で C57BL/6 (B6)と DBA/2 (D2)の系統の異なるマウスの雑種 1 代目 (F1) の大脳皮質を用いて CNR の転写産物の解析をおこなった。B6 と D2 とでは、CNR3 の遺伝子の可変領域に 1 つ、定常領域に 3 つの異なる塩基配列がある。F1 マウスの細胞は、B6 由来の染色体と D2 由来の染色体をそれぞれ 1 対ずつ持つことになるので通常ならば CNR3 の転写産物は可変領域、定常領域ともに B6 由来あるいは D2 由来の Cis 型となる。しかし、生後 60 日目の F1 マウスの CNR 3 転写産物をシーケンス解析した結果、約 10% が可変領域が B6 由来で定常領域が D2 由来あるいはその逆の Trans 型として発現していることを明かにした。また、Trans 型の転写産物は、胎生 15 日目 (E15)、生後 1 日目 (P1)、生後 60 日目 (P60) と発生が進むにつれて増加することがわかった。

同時に、彼は CNR 3 転写産物をシーケンス解析することで体細胞突然変異の有無についての検討をおこなった。P60 の大脳皮質から抽出した CNR 3 転写産物には一塩基あたり  $2.6 \times 10^{-3}$  という高頻度の塩基置換が検出され、同じく P60 の大脳皮質から抽出した E-カドヘリンの転写産物  $1.3 \times 10^{-3}$  との比較においても統計学的にも有意に高かった。P60 において検出した高頻度の塩基置換が体細胞突然変異であるならば、脳の発生に伴い変異の頻度が変化することが予想された。E15、P1 を解析したところ、 $1.7 \times 10^{-3}$ 、 $2.4 \times 10^{-3}$  と発生に伴って増加することが明らかとなった。突然変異は、A から G、T から C への塩基置換が多く、塩基置換の傾向はランダムではなかった。特に、CNR 3 の 3' 末端側の非翻訳領域にある CU 繰り返し配列は germ line の DNA 配列では 6 回であるのに対し、P60 の CNR 3 転写産物では約 70% が 7 回の CU 繰り返しに変わるという高頻度の変化を認めた。また、Cis 型と Trans 型の転写産物における突然変異率の比較では Trans 型の方が Cis 型にくらべて有意に突然変異率が高いことがわかった。これらの結果から、CNR 遺伝子の転写産物に体細胞突然変異が起きていることが強く示され、突然変異の起こるメカニズムと Trans 型のできるメカニズムに関連があることが示唆された。

興味深いことに、アミノ酸置換を伴う変異率は細胞外領域の EC1 ドメインでのみ高頻度で起きているということである。EC1 ドメインは、クラシカルなカドヘリンではホモフィリックな細胞接着に重要であることが示されており、CNR では大脳皮質の層構造形成に重要な Reelin と結合することから機能的にも重要な役割を果たしていると考えられている。よって、EC1 ドメインのアミノ酸置換は CNR の

機能に影響を与えるものと考えられる。一方、その他のドメインではアミノ酸置換を伴う変異率は発生が進むにつれて減少する。このことから、EC1 ドメインでアミノ酸置換をおこしたもののうち、他のドメインではアミノ酸置換の少ない *CNR* が脳の発生に伴って選択されている可能性が示唆された。

本研究は、シナプスで発現する *CNR* 遺伝子の転写産物に体細胞突然変異が起きていることをはじめて示し、何らかの選択機構が働いている可能性を示唆した。*CNR* 遺伝子の転写産物の体細胞突然変異は *CNR* がシナプスに局在することから神経ネットワークの可塑的な変化を担う分子メカニズムとして興味深い。

## 論文の審査結果の要旨

本博士論文は、チロシンリン酸化酵素 Fyn の結合タンパク質として同定された、カドヘリン様接着分子 CNR における多様性の分子メカニズムを探究している。特に、CNR ファミリー遺伝子の発現メカニズムに、免疫系の免疫グロブリンや T 細胞受容体遺伝子でみられるような体細胞変異が存在するかどうかを検討した。まず、系統の異なる C57BL/6 (B6) と DBA/2 (D2) 間の 1 代雑種 (F1) の大脳皮質を用いて、CNR3 の転写産物の解析を行った。CNR は可変領域と定常領域からなるが、F1 マウスの CNR3 転写産物をシーケンス解析したところ、約 10% が B6 の可変領域と D2 の定常領域を有する Trans 型あるいは、その逆のパターンの Trans 型として発現していることが明らかとなった。また、体細胞点変異に関し、CNR3 転写物には 1 塩基あたり  $2.6 \times 10^{-3}$  という高頻度で塩基置換が確かめられ、それは脳の発生に伴って増加することが示された。A から G と T から C への置換が多く、Trans 型の方が Cis 型に比べて有意に置換率が高いといったように、塩基置換の傾向はランダムではなかった。この結果から、点変異の起るメカニズムと Trans 型のできるメカニズムに関連のあることが示唆された。さらに、クラシカルなカドヘリンにおいてはホモフィリックな相互作用に重要である EC1 ドメインに対応する細胞外領域でのみ、アミノ酸置換を引き起こす変異が高頻度で起きていた。この脳の発生とともに生じる体細胞変異の傾向は、大脳皮質の層構造形成に重要な Reelin との結合の変化に強く関連すると思われる。

以上の結果は、今まで免疫系に多様性をもたらすことが示されてきたメカニズムが、神経系においても働いていることを強く示唆する興味深い知見である。また、CNR がシナプスに結合することを考慮すると、CNR の体細胞変異が神経ネットワークの可塑的变化を司る分子メカニズムであるとも考えられる。以上、本論文は学位論文としてふさわしい内容であり、論文の論理性も充分であることから、審査委員会で一致して合格に値すると判定した。

学位論文として提出された研究結果について説明した後、審査委員が研究の内容及び関連する知識について試問を行った。その結果、研究内容の把握、位置付け、結果の考察、基礎知識ともに、博士号を授与するのに充分であると判断された。また、学位論文は平易な英語で書かれており、申請者の語学能力も確認された。以上、総合的に判断し、学位を取得するに足る水準に達しているものと判断する。