

氏 名 光 村 直 洋

学位（専攻分野） 博士(学術)

学 位 記 番 号 総研大甲第283号

学位授与の日付 平成9年3月24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 A Novel Cadherin Subfamily, the CNR Family, is
Associated with Fyn, and Concentrated in the
Postsynaptic Density Fraction of the Mouse
Brain

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 小幡 邦彦
教 授 池中 一裕
教 授 伊佐 正
助 教 授 森 泰生
教 授 三品 昌美（東京大学）

論文内容の要旨

(目的) 非レセプター型チロシンキナーゼのFynは、神経系及び免疫系で高い発現が認められている。神経系においては特にオリゴデンドロサイト、神経細胞成長円錐で強く発現し、神経細胞ではPSD(Postsynaptic Density)画分に濃縮している。Fynは細胞膜に存在するレセプター分子と結合し細胞外のシグナルを細胞内に伝えている。免疫系でFynと結合するレセプター分子群はT細胞のTCR複合体やB細胞のmIg複合体など多数知られており、神経系ではオリゴデンドロサイトに発現しているmyelin-associated glycoprotein (MAG)が知られている。また、神経筋接合部で機能しているnicotinic acetylcholine receptor (AChR)がシビレイの発電器官でFynと結合していることも知られている。しかし、脳の神経細胞でFynと結合しているレセプター分子は現在まで得られていない。ジーンターゲット法によりFynを欠損させたマウスは、脳の構造、学習、記憶、本能行動に異常が見られることが報告されており、Fynが中枢神経系形成や行動制御に関連していることが明らかとなっている。脳の神経細胞において細胞外からのFynを介した情報伝達機構を解明することは、脳の高次機能を分子レベルで理解する上で新たな知見が得られると考えられる。当研究室の甲斐らは以前、酵母を用いたTwo-hybrid法によりFynのunique-SH3-SH2領域と結合する多数の分子をクローニングした。それらの中の1つに疎水性アミノ酸に富んだ膜貫通ドメインと思われる領域とカドヘリンモチーフを持つ新たな分子が存在し、CNR1(Cadherin-related neural receptor 1)と命名された。ノーザンブロット法により脳特異的で生後10日目に発現のピークがあることが分かった。既知の幾種かのカドヘリン分子は脳においてシナプスで強く発現していることが知られており、CNR1は脳に存在しFynに結合しているレセプター分子でありFynと共に中枢神経系形成や行動制御に関連している可能性が考えられたので本研究ではこの分子について詳しく解析した。

(結果) マウス脳のcDNAライブラリーを作製しスクリーニングを行った結果、CNR1の全長cDNAを得ることができた。CNR1は細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインで構成されていた。細胞外ドメインに6回のカドヘリンリピートが存在し、第1カドヘリンリピートにはインテグリンに結合するモチーフであるRGD配列が確認された。カドヘリンスーパーファミリーの中でRGD配列を持つものは現在まで知られておらず、CNR1が初めてである。膜貫通ドメインから細胞内ドメインにかけてはシステイン残基が規則的に出現する構造が確認された。また、細胞内ドメインにSH3と結合するモチーフであるPXXP配列が5回存在した。CNR1のcDNAと同時に塩基配列レベルで88.4%一致する違ったタイプのものも得られ、CNR2と命名した。CNR2はCNR1で認められた構造や特徴がとてよく保存されており、驚くことに細胞内ドメインの途中からpolyAまでは全く同じ塩基配列であった。CNR1とCNR2に保存された配列をプローブに用いてゲノミックサザンブロット法を行った結果、CNRは約20種類からなるファミリーを形成しており、未知のCNRが存在すると考えられた。そこでN末とC末の保存された配列から2種類のプライマーを作製しRT-PCRを行った結果、新たに6つの違ったcDNAが得られ、CNR3からCNR8と命名した。CNR1とCNR2で保存されていた配列や特徴がこれらにもよく保存されていた。得られた8種類それぞれのCNRに特異的な配列を用いてRT-PCRとゲノミックサザンブロット法を行ったところ、それぞれのmRNAは実際に脳に存在し、ゲノム上の違った遺伝子座に載っていることが分か

り、実際にファミリーを形成していることが確かめられた。CNR1の蛋白質レベルでの解析を目的とし、CNR1の細胞外ドメインを抗原にしてウサギ抗血清とマウスモノクローナル抗体6-1Bを作製した。CNR1蛋白質の脳における発生過程での存在量をウェスタンブロッティング法により調べたところ生後7日までは増加し生後30日には減少していた。これはノーザンブロッティング法で得られた結果とほぼ一致していた。脳の細胞分画をサンプルに用いたウェスタンブロッティング法よりCNR1はFynと同じようにPSD画分に濃縮していることが分かった。Fynに対するモノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行ったところCNR1が共沈してくることが分かりCNR1とFynが実際に生体内で結合していることが確かめられた。大腸菌で合成したCNRとFynの蛋白質を用いたELISAよりCNRの細胞内ドメインの保存された配列はFynのSH3に結合することが分かった。

(考察) CNRファミリーの構造を細かく検討するとファミリー間でよく保存されているものの、既知のカドヘリン分子とは特に第1カドヘリンリピートや細胞内ドメインの構造が異なっており、今までの研究で得られてきたカドヘリンの細胞間接着能とは違った機能を持つことが考えられる。脳においてCNR1はPSD画分に濃縮しており、しかもCNRファミリーはFynと結合していた。PSD画分に存在する蛋白質は、シナプス可塑性及び行動制御に関連することが現在までに明らかになっており、その一つのFyn蛋白質とCNRファミリーが結合していることを考えるとCNRは今後、脳機能の分子メカニズムを解明して行く上で興味深い分子群であると想定される。さらに約20種からなるファミリーを形成していること、細胞接着活性が想定されることよりCNRファミリーは個々のシナプス間の特異的接着に関与している可能性があり、神経回路形成における役割が考えられる。

審査結果の要旨

非レセプター型チロシンキナーゼのFynは、神経系及び免疫系で高い発現を示し、細胞膜に存在するレセプター分子と結合し細胞外のシグナルを細胞内に伝えている。免疫系での多くの知見に比し、神経系でFynと結合しているレセプター分子は現在まで得られていない。Fynを欠損させたマウスは、脳の構造、学習、記憶、本能行動に異常が見られることが当専攻八木助手らにより報告され、Fynが中枢神経系形成や行動制御に関連していることが明らかとなっている。脳の神経細胞において細胞外からのFynを介した情報伝達機構を解明することは、脳の高次機能を分子レベルで理解する上で重要である。八木らは、Fynのunique-SH3-SH2領域と結合する分子をクローニングし、その1つとしてカドヘリンモチーフを持つ新たな分子を見出し、CNR1(Cadherin-related neural receptor 1)と命名した。本研究ではこの分子を手がかりとして細胞膜に局在するFyn結合分子を解析した。

マウス脳のcDNAライブラリーから、CNR1の全長cDNAを得た。CNR1は6回のカドヘリンリピートを持つ細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインで構成されていた。またインテグリンに結合するモチーフのRGD配列及びSH3と結合するモチーフであるPXXP配列が存在した。さらにcDNAクローニング、ゲノミックサザンブロッティング、RT-PCRの結果、CNRは約20種類からなるファミリーを形成していることが判明し、新たに7つの違ったcDNAを得て、CNR2からCNR8と命名した。CNR1の配列や特徴がよく保存されていた。得られた8種類はそれぞれのmRNAは実際に脳に存在し、違った遺伝子にコードされていることが分かり、実際にファミリーを形成していることが確かめられた。ついで特異抗体を作製してCNR1の蛋白質レベルでの解析を行った。CNR1蛋白質は脳で生後7日までは増加し生後30日には減少していた。脳の細胞分画ではCNR1はFynと同じようにPSD画分に濃縮された。免疫沈降でCNR1がFynと共沈してくることからCNR1とFynが実際に生体内で結合していることが確かめられた。CNRとFynのELISAよりCNRの細胞内ドメインはFynのSH3に結合することが分かった。

CNRファミリーの構造には既知のカドヘリン分子とは異なっている部分があり、カドヘリンとは違った細胞間接着能を持つと考えられる。脳においてCNR1はFynと同様、シナプス部に局在するとみなされ、脳機能に関与する重要な分子群であると想定される。さらに個々のシナプス間の特異的接着に関与している可能性があり、神経回路形成における役割が考えられる。

以上の研究は神経系における細胞間及び細胞内情報伝達の分子機構を探求するもので、細胞生物学、神経科学において価値あるものと判定した。

また、研究成果は、2編の論文にまとめて国際誌に投稿準備中であり、修士課程においても筆頭著者として英文原著論文を出版していることから、外国語、論文作成の能力は十分であると判定した。関連事項についての試問にも的確な解答が得られたことから、生理学・生命科学につき十分な学識を有すると判定した。