

氏 名 先 崎 浩 次

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第478号

学位授与の日付 平成12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 Proteins of the CNR, Cadherin-Related Neuronal
Receptor, Family Play Crucial Roles in Mouse
Cortical Cell Layer Formation

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 小幡 邦彦
教 授 井本 敬二
教 授 池中 一裕
小川 正晴（理化学研究所）

論文内容の要旨

彼は本研究でマウス大脳皮質層構造形成過程において CNR ファミリーが Reelin 受容体として機能している新たな分子機構を明らかにした。

大脳皮質層構造形成機構に関与する分子として、これまでに Reelin と mDab1 が突然変異マウスである *reeler* 及び *scrambler* マウスの解析により明らかにされている。Reelin は Cajal-Retzius 細胞より分泌される細胞外分子であり。mDab1 は皮質神経細胞で発現する細胞内情報伝達物質である。また、Reelin 依存的に皮質神経細胞の mDab1 のチロシンリン酸化がおこることが知られていることより、Cajal-Retzius 細胞から分泌された Reelin が皮質神経細胞の Reelin 受容体を介して mDab1 のチロシンリン酸化をおこし、皮質神経細胞の層構造形成に関与していることが示唆されている。この Reelin 受容体の解明が大脳皮質層構造形成の分子機構を考える上で必須でありながら、これまで、Reelin の受容体は明らかではなかった。CNR はチロシンリン酸化酵素 Fyn との結合活性により単離・同定された新規カドヘリン様膜分子であり、マウス神経系に発現が認められ、シナプス部位に局在する多様性を持った分子群 (CNR ファミリー) であることがこれまでに明らかにされている。

本研究では、CNR ファミリーと結合する Fyn を欠損したマウスでの大脳皮質及び海馬の層構造形成異常、Fyn が mDab1 のチロシン残基をリン酸化するとの報告より、CNR ファミリーが Reelin の受容体分子であると仮説をたて検証を行った。

その結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) 胎生期における CNR ファミリー mRNA の発現様式を *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した結果、CNR ファミリー mRNA はそれぞれ大脳皮質形成過程の cortical plate において強い発現が認められた。この結果は、大脳皮質層構造形成過程において CNR ファミリーが Reelin の受容体分子として機能する可能性を示唆した。
- 2) CNR1 と Reelin の結合性をそれぞれの融合蛋白質を用いて免疫沈降法により解析した結果、CNR1 細胞外領域と Reelin が特異的に結合することが明らかとなった。また、この結合状態を表面プラズモン共鳴装置を用いて解析した結果、結合部位が 1ヶ所であること、KD 値が 1.7 であることが明らかになった。この 1.7 の KD 値はリガンドとレセプターの KD 値として妥当であり、CNR1 が Reelin の受容体である可能性が強く示唆された。
- 3) Reelin の部分融合蛋白質を作製し免疫沈降法による CNR1 結合部位の解析を行った結果、Reelin の第 1 Reelin Repeat B 領域が CNR1 結合部位であることが明らかとなった。また、この領域は Reelin の機能阻害抗体である CR-50 の認識部位とは異なる領域であった。しかし、Reelin と CNR1 の結合性が CR-50 により阻害されたことより、CNR1 が Reelin の機能的な受容体であること、及び、Reelin の N 末側が複雑な蛋白質構造をとっていることが示唆された。
- 4) CNR1 の部分融合蛋白質を作製し、免疫沈降法により CNR1 の Reelin 結合部位の解析を行った。その結果、CNR1 の EC1 領域で RGD モチーフを含む 30 アミノ酸配列が Reelin との結合に必要なことが明らかになった。また、この RGD モチーフを RGE に替えた融合蛋白質では Reelin との結合性が認められないことから、結合に RGD モチーフが必要であることが示唆された。
- 5) Reelin との結合に必要な CNR1 の EC1 領域の 30 アミノ酸配列は CNR1-8 で、完全に保存されていた。このことは、CNR1-8 全てが Reelin と結合する可能性を示唆した。この可能性を検証したところ、CNR1 だけではなく CNR2、3 も Reelin の全長に対し結合性を示した。このことより、CNR ファミリーは Reelin に対する多重受容体であることが明らかになった。また、CNR と同様にカドヘリンモチーフを

持つ E-cadherin では Reelin と結合しないことから、CNR ファミリーの EC1 領域が Reelin に対して特異的結合性を持つことが明らかとなった。

6) Reelin と結合している EC1 領域のプロープで Zoo blot を行ったところ、両生類で 2 本、は虫類で 4 本、鳥類で 8 本、哺乳類では 20 本のバンドが検出され、脳の進化にともない Reelin と結合する CNR 遺伝子の数が徐々に増えていることが明らかになった。

7) Reelin との結合に必要な CNR の 30 アミノ酸配列に対するモノクローナル抗体 (RBD 抗体) を作製し、Reelin と CNR1 との結合性に対する影響を調べた結果、RBD 抗体は Reelin との結合性を阻害する抗体であることが明らかになった。また、RBD 抗体が Reelin 依存的におこる初代培養皮質神経細胞の mDab1 のチロシンリン酸化を抑制したことより、Reelin 依存的 mDab1 のチロシンリン酸化が CNR を介して引き起こされることが明らかとなり、皮質神経細胞に存在する CNR が Reelin の mDab1 リン酸化に関わる機能的受容体であることが明らかとなった。

8) RBD 抗体の大脳皮質層構造形成への影響を調べるために、大脳皮質神経細胞の再凝集培養系を用いて観察した結果、RBD 抗体は神経細胞の移動を阻害することが示された。このことより、CNR は大脳皮質層構造形成過程で Reelin の受容体として機能するだけでなく、細胞移動過程に関与する可能性が示唆された。

9) RBD 抗体を用いた免疫染色法により、CNR 蛋白質と Reelin 蛋白質の局在が一致することが明らかになった。また、正常マウスにおいては CNR 蛋白質は粒状のシグナルで観察されたが、Reelin 蛋白質のない reeler マウスにおいては、粒状のシグナルが消え、染色が強くなった。このことから、CNR ファミリー蛋白質と Reelin 蛋白質とが直接相互作用し、Reelin 蛋白質の局在が CNR 蛋白質の局在を規定している可能性が示唆された。

以上のことをまとめると、CNR ファミリーは大脳皮質層構造形成過程において Reelin に対する多重受容体として存在し、Reelin のシグナルを mDab1 へ伝えている膜分子群であることが明らかとなった。

また、陸棲脊椎動物の大脳皮質の進化の過程において層構造が徐々に増加していることが Marin-Padilla らの研究によって明らかとなっている。この層構造の増加と Reelin と結合する CNR 遺伝子の数の増加との関連性は今後の興味深いテーマであると考えられる。

論文の審査結果の要旨

八木 健らの非受容体型チロシンリン酸化酵素 Fyn に関する研究において、マウス神経系に発現する Fyn 結合性蛋白質として CNR (cadherin-related neuronal receptor) が単離・同定された。これはシナプス部に局在する新規カドヘリン様膜分子で、多様性を持った分子群 (CNR ファミリー) を構成する。また大脳皮質形成に関与する分子としては Reelin と mDab1 が知られており、Cajal-Retzius 細胞から分泌された Reelin が、皮質神経細胞に作用して mDab1 をチロシンリン酸化し、皮質層構造形成に関与することが示唆されているが、Reelin 受容体の実体は不明である。

申請者は CNR ファミリーの大脳皮質形成過程における役割を研究し、CNR ファミリーが Reelin 受容体として機能していることを発見した。

実験結果は以下のとおりである。1) *in situ* ハイブリダイゼーションで、大脳皮質形成過程の cortical plate に CNR ファミリー mRNA の強い発現がみられた。2) CNR1 と Reelin の結合性を免疫沈降法により解析した結果、CNR1 細胞外領域と Reelin が特異的に結合した。この結合を表面プラズモン共鳴装置で解析したところ、結合部位は1ヶ所、KD 値はリガンドとレセプターの KD 値として妥当な 1.7 であった。3) Reelin の CNR1 結合部位を Reelin の部分融合蛋白質を用いた免疫沈降法で解析した結果、第 1 Reelin Repeat B 領域が CNR1 結合部位と同定された。また、Reelin の機能阻害抗体である CR-50 は Reelin と CNR1 の結合を阻害した。4) CNR1 の Reelin 結合部位を CNR1 の部分融合蛋白質を用いて同様に解析した結果、EC1 領域で RGD モチーフを含む 30 アミノ酸配列が結合部位と同定された。また、この RGD を RGE に替えた融合蛋白質では Reelin との結合性が認められない。5) CNR1 の EC1 領域の 30 アミノ酸配列は CNR1-8 で完全に保存されており、すべての CNR が Reelin と結合する可能性を示唆した。実際に CNR2、3 も Reelin に対し結合性を示した。6) 動物の進化とともに CNR 遺伝子の数が増加することを見いだした。7) CNR の Reelin 結合領域に対して作製したモノクローナル抗体 (RBD 抗体) は CNR1 と Reelin との結合を阻害し、培養細胞における mDab1 の Reelin 依存的チロシンリン酸化を抑制した。8) 大脳皮質神経細胞の再凝集培養系において、RBD 抗体は神経細胞の移動を阻害した。9) 免疫組織化学で CNR と Reelin の局在の一致が示された。Reelin 欠損マウスでは CNR の粒状の細胞内分布が消失しており、Reelin が CNR の局在を規定することが示唆された。

以上の実験結果から、CNR ファミリーは大脳皮質形成過程において Reelin に対する多重受容体として存在し、Reelin のシグナルを mDab1 へ伝えている膜分子群であり、神経組織形成に関与すると結論された。本研究は大脳皮質形成の分子機構に重要な知見を加えたものであり、神経発生生物学に対する寄与は大きく、学位論文として十分な内容を持つ。

審査委員会では本論文の内容について審査した後、背景となる学説、研究手法、さらに関連分野である細胞生物学、神経発生学の学識に関して口頭試問を行った。これらに対する応答はいずれも満足すべきものであった。

また、申請者が筆頭著者として作成した英語原著論文が本論文の内容のもの1編を含めて2編、国際的学術雑誌に掲載されているので(1編は equal contribution)、英語の能力および研究の達成度は十分であると認められた。

以上、総合的に判断して、学位取得に値すると判定した。