氏　　名	武藤哲司
学位（専攻分野）	博士(理学)
学位記番号	総研大甲第615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	Cell-Adhesion Activity of Cadherin-Related Neuronal Receptor(CNR)Family
論文審査委員	主　査　教授　小幡　邦彦 教授　池中　一裕 教授　岡田　泰伸 教授　月田　承一郎（京都大学） 教授　八木　　健（大阪大学）

論文内容の要旨

神経細胞間における情報伝達の場として高度に組織化された接着構造であるシナプスには、カドヘリンやインテグリンをはじめとした様々な接着分子が存在する。CNR ファミリー分子群は、Fyn チロシンキナーゼに結合し、シナプスに存在するカドヘリン型受容体としてクローニングされてきた。CNR は成体マウス脳において、シナプスに存在することが示されているが、クラシックカドヘリンが存在するシナプティックアドヘレンスジャンクションではなく、NMDA レセプターなどが存在する、アクティブゾーンと呼ばれる部位に局在する (Kohmura et al., Neuron 20, 1137-1151, 1998)。 CNR は他のカドヘリンファミリーとは異なり、複数のタンデムに並ぶ可変領域エクソンと、定常部位のエクソンからなるゲノム構造を持つ。また最近 CNR3 において、シナプス形成期から成体にかけての転写産物に、体細胞的なミューテーションが認められ、特に EC1 ドメインではアミノ酸置換が頻繁に起こっていることが示唆されている (Hirayama et al., Gene to Cells 6, 151-164, 2001)。したがって、CNR には細胞外ドメインの多様性を生み出すメカニズムが存在すると思われ、その多様化していると思われるタンパク質の機能発現様式には大きな注目が集まっている。近年、CNR がマウス胎生期において大脳皮質に発現し、大脳皮質の層構造形成に必須とされる分泌タンパク質である Reelin の受容体として働くことが示されたが、この他には CNR の脳内での機能は明らかになっていなかった(Senzaki et al., Cell 99, 635-647, 1999)。

本研究ではカドヘリンモチーフを持つ CNR ファミリー分子群の接着活性を解析する事を目的として接着活性系の開発を行っている。まず細胞接着実験を行うため、CNR1 タンパク質を L 細胞に発現させた。L細胞は古典的に多くのカドヘリンファミリーの接着実験に汎用されてきた細胞株であり、クラシカルカドヘリンの一つの E-cadherin は L 細胞に発現すると細胞膜に局在する。しかし、CNR1 は L 細胞に発現させた場合には小胞体にとどまって、細胞膜上に局在しなかった。このため、種々の細胞株(HEK293T、Neuro2A、COS7、CHO、CHP212、MDCKII)に CNR1 タンパク質を発現させてその局在を解析した。すると、HEK293T 細胞でのみ、発現させた CNR1 が細胞膜に移行していることが明らかとなった。

この現象をふまえ、CNR1 を発現させた HEK293T 細胞を用いた細胞接着実験を行なったところ、カルシウム依存的な細胞間接着分子としての性質が、CNR1 に確認された。次にこの CNR1 の接着活性がホモフィリックなものなのかどうかを検証するため、CNR1 の細胞外ドメインタンパク質を精製、固相化して、HEK293T 細胞を用いた接着実験を行った。すると興味深いことに CNR1 非発現細胞も CNR1 細胞外ドメインとの結合性を持つことがわかり、CNR1 は自らとは異なる分子とのヘテロフィリックな結合活性を持つ事が示唆された。一方で、CNR1 ビーズを作製しておこなった in vitro における CNR1 同士の結合実験では、CNR1 分子同士のホモフィリックな強い結合活性は認められなかった。

CNR1 とインテグリンのヘテロフィリックな結合活性は CNR1 の EC1 ドメインのみを用いた実験でも認められた。さらに、この接着活性はインテグリン特異的接着阻害ペプチドである RGDS によって大幅に阻害されることから、RGD 感受性のインテグリンが受容体であることが示唆された。また、インテグリン複合体でもっとも多く使われるβ1 インテグリンサブユニットに対する機能阻害抗体によっても接着が阻害され、CNR1 の配列をもった 11 アミノ酸のペプチドによって、fibronectin に対するインテグリンの接着活性が阻害されることも示された。さらに、CNR1 タンパク質を発現した HEK293T 細胞の免疫染色像では、CNR1 とβ1 インテグリンが細胞膜上で共存している像が観察された。以上の結果か

ら、CNR1 はインテグリン複合体を相手とした、ヘテロフィリックな細胞接着活性を有することが強く示唆された。

これらの結果を踏まえて、in vivo で CNR とβ1 インテグリンとが脳内で相互作用しうるかどうかを検証するため、マウス脳を用いた免疫染色を行った。その結果マウス小脳皮質において、分子層形成に伴いCNRとβ1インテグリンの免疫反応は時空間的にほぼ重なって推移していることがしめされた。レーザー共焦点顕微鏡を用いて強拡大で観察した結果、分子層における両者の点状の免疫反応は部分的に重なっていた。また興味深いことに、分子層におけるシナプス新生が一通り完了した生後 2 週以降、β1 インテグリンの免疫反応は CNR に先んじて減弱していた。このことはマウス脳においてシナプス形成の初期段階で、CNR とβ1 インテグリンが共役して機能している事を示唆する。

本研究により、今まで細胞膜に移行しないために測定ができなかった CNR1 の接着活性の有無が初めて明らかにされた。近年、多くのカドヘリンスーパーファミリー分子群がシナプスに発現していることが示されているが、以上の結果は、CNR がシナプスに局在する接着分子としての機能を持ちながら、他のカドヘリンファミリーとは異なった局在機構、接着機能を有し、神経回路形成の局面において独自の役割を持っていることを示唆している。

論文の審査結果の要旨

出願者の研究指導を行った八木　健らは、非レセプター型チロシンキナーゼである Fyn が神経系のシナプス機能、組織形成に深く関与していることを、遺伝子ノックアウトマウスの作製・解析によって見いだし、Fyn を介する情報伝達系の解明を進めている。その一環として、Fyn に結合している膜レセプターとして新規タンパク質群を発見し、この分子構造がカドヘリンに類似することから cadherin-related neuronal receptor (CNR)と命名した。CNR は大脳皮質の層構造形成に必須とされる Reelin のレセプターとして働くこと示されたが、他の役割については不明である。クラシックカドヘリンはシナプスではアドヘレンスジャンクションに局在するが、CNR はシナプスのアクティブゾーンに局在しており、その接着機構の異同は重要な問題である。

本論文は CNR(CNR1 を使用)の接着活性を解析し、CNR は、カドヘリンによるようなホモフィリックな接着ではなく、他の接着分子インテグリンとヘテロフィリックな結合を介して接着させることを証明したものである。実験には、主に 1) CNR1 を細胞膜に発現させた HEK293T 細胞、2) CNR1 細胞外ドメインを固相化した培養皿、3) CNR1 を表面に固相化したビーズを用い、以下の結果を得た。1. 細胞株に発現させた CNR1 の細胞膜への移行はカドヘリン研究で汎用されるL細胞や他の多くの細胞では起こらず、HEK293T 細胞でのみみられたことから、細胞内輸送機構がカドヘリンと異なることがわかった。2. CNR1 による細胞接着もカルシウム依存的である。3. その細胞接着は CNR1 同士のホモフィリックな結合ではなく、他分子とのヘテロフィリックな結合による。4. CNR1 とはインテグリンとヘテロフィリックな結合を起こし、これは CNR1 の EC1 ドメインによる。5. この接着活性はインテグリン特異的接着阻害ペプチド RGDS および β1 インテグリンサブユニットに対する機能阻害抗体で阻害されることから、RGD 感受性 β1 インテグリンが関与すると考えられる。6. CNR1 の配列をもったペプチドが、インテグリンの fibronectin に対する接着活性を競合的に阻害する。7. CNR1 タンパク質を発現した HEK293T 細胞では、CNR1 と β1 インテグリンが細胞膜上で共存している。8. 発達期マウス小脳の免疫組織化学において、分子層形成に伴い CNR と β1 インテグリンの発現は時空間的にほぼ重なって推移し、成熟につれて減弱していることが示された。

以上のように本研究は新規因子 CNR が関与する新たな細胞接着機構を解明し、神経組織形成への関与を示唆したものであり、細胞生物学、発生神経生物学での明確な貢献である。

審査委員会における研究発表は明解であり、つづいて実施した試問で以下の点も明らかになった。実験はすべて申請者が実施したものであり、細胞生物学の実験技術、自ら企画遂行する研究能力、関連分野の学識は十分と判定された。上記の研究成果は原著論文として国際誌に投稿済みであり、本学位論文も適切な英文で書かれていることから、英語力は満足できるものと判定された。