

氏名	なか しば とし あき 仲 柴 俊 昭
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2321 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	Divergence of the UNC-6/Netrin family; Molecular cloning and functional characterization of glycosyl phosphatidylinositol-linked netrin-G subfamily members, netrin-G1 and netrin-G2, which promote neurite outgrowth (Unc-6/Netrin ファミリーの多様性; 神経突起伸長活性を有するグリコシルフォスファチジルイノシトール結合型ネトリン G サブファミリーメンバー、ネトリン G1 とネトリン G2 分子の分離同定および、その機能解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 伊 藤 維 昭 教 授 丸 岡 啓 二 助 教 授 秋 山 芳 展

論 文 内 容 の 要 旨

脳神経系が担う高次の情報処理は、複雑かつ秩序だった神経回路網の形成によって担われている。その分子基盤の解析は、近年進展著しい神経科学の中心課題の一つである。分泌性のネトリンファミリーは、長距離作動性の軸索誘引因子として同定された最初の分子である。ネトリンファミリーは種を越えて高度に保存されている。申請者は小脳において細胞間情報伝達分子を網羅的に探索する実験の中から、ネトリンファミリーに属する新規分子をコードする遺伝子を同定するに至り、それら新規分子の特性を古典的ネトリン分子のそれと比較解析した。

マウス 3 週齢小脳から、シグナルシークエンストラップ法を用い、分泌タンパク質および膜タンパク質をコードする遺伝子の網羅的検索を行った。小脳の発達に伴って発現レベルが変化する遺伝子について集中的に解析した結果、ネトリンファミリーに分類される新規遺伝子、ネトリン G1 を分離同定した。さらに、類縁遺伝子としてネトリン G2 を分離同定した。これらのネトリン G タンパク群は、従来の分泌性の古典的ネトリンタンパクと類似のドメイン構造を持っていたが、Glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) lipid anchor によって細胞膜表面に局在する特徴を持つことを明かとし、ネトリン G タンパクが短距離作動性因子であることを示唆した。ネトリン G1 と G2 遺伝子は、脊椎動物に特有な遺伝子として出現し、サブファミリーを形成している事を示唆した。また、両遺伝子は多数のスプライシングバリエントを生成することを明かした。

ネトリン G サブファミリーは、古典的ネトリンサブファミリーの受容体である UNC-40/DCC ファミリーおよび UNC-5 ファミリーに対して結合しないことを示した。また、古典的ネトリンと異なり、ネトリン G は胎生期の小脳板を用いた *in vitro* コラーゲンゲル中での軸索誘引活性を持たないことを示した。これらの結果に基づいて、ネトリン G サブファミリーが古典的ネトリンサブファミリーと機能的に重複しないことを示唆した。ネトリン G1 および G2 遺伝子の発現を *in situ* hybridization 法によって詳細に調べ、多くの前脳領域で相互排他的に発現をしていることを示した。それぞれに対する特異的抗体を用いて、ネトリン G1 は、軸索に多く局在することを明らかにした。抗ネトリン G1 抗体による免疫組織化学的解析は、ネトリン G1 の視床皮質路および嗅索の軸索上への特に顕著な局在を明らかにした。本抗体を用いた研究により、視床から皮質への投射と、皮質から視床への投射が独立した経路を辿ることを初めて明らかにし、視床皮質路の形成機構に関する誤った既存の仮説を訂正した。

視床と大脳皮質でそれぞれネトリン G1 とネトリン G2 遺伝子の発現が最も強いことと、視床と大脳皮質では相互に軸索を投射していることから、申請者は、これらの領域のニューロンに対するネトリン G ファミリーの機能を検証することを試みた。精製ネトリン G タンパクを細胞培養皿に固相化し、その上に胎生期の視床、または大脳皮質より取り出した細胞を分散培養した。この実験により、固相化されたネトリン G1 および G2 タンパクともに、両組織由来の神経細胞に対して

突起を伸長させる活性を有している事を明かした。一方、抗ネトリン G1 抗体を基質として用いた培養実験で、ネトリン G 分子が逆方向のシグナル伝達を介在する証拠の一つを提示した。細胞培養の結果と脳組織での遺伝子の発現特性およびタンパク質の分布の成績にもとづいて、ネトリン G 分子が大脳皮質と視床間の神経回路網形成機構において重要な役割を果たすことを示唆した。

膜結合型のネトリン G サブファミリーが脊椎動物に存在することを明らかとし、古典的ネトリンファミリーと機能的に重複しないとの結論に達した。これらの結果は、ネトリンファミリーが脊椎動物において、機能的に著しい多様性を獲得したことを示唆している。

論文審査の結果の要旨

脳神経系が担う高次の情報処理は、複雑かつ秩序だった神経回路網の形成によって担われている。神経回路網の形成過程は、おおまかに軸索の誘導、標的認識、シナプスの形成の3段階に分けられる。軸索の誘導および標的認識には、誘引または反発因子によって制御されるが、それらには遠距離作動性のものと近距離作動性のものが存在する。分泌性のネトリンファミリーは、長距離作動性の軸索誘引因子として同定された最初の分子である。ネトリンファミリーは種を越えて普遍的に存在しているが、その多様性については不明である。申請者は小脳において細胞間情報伝達分子を網羅的に解析する実験系を立ち上げ、解析を進めたところ、ネトリンファミリーに属する新規分子をコードする遺伝子を同定するに至った。本研究は、それら新規分子の特性を古典的ネトリン分子と比較解析したものである。

マウス3週齢小脳から、シグナルシークエンストラップ法を用い、分泌タンパク質および膜タンパク質をコードする遺伝子の網羅的検索を行った。小脳の発達に重要な役割を果たす遺伝子は発達過程で発現量が変化するとする作業仮説のもと、ディファレンシャルハイブリダイゼーション法およびRT-PCR法によって発現が変化する遺伝子を選別した。そのうちの一つを、ネトリンファミリーに分類される新規遺伝子、ネトリン G1 として同定した。さらに、類縁遺伝子としてネトリン G2 を分離同定した。これらのネトリン G タンパク群は、従来の分泌性の古典的ネトリンタンパクと類似のドメイン構造を持っていたが、Glycosylphosphatidylinositol (GPI) lipid anchor によって細胞膜表面に局在する特徴を持つことを明かした。ネトリン G タンパクが短距離作動性因子であることを示唆した。ネトリン G 遺伝子は、脊椎動物に特有な遺伝子として出現し、多様化してサブファミリーを形成している事を示唆した。

ネトリン G サブファミリーは、古典的ネトリンサブファミリータンパクに対する受容体である UNC-40/DCC ファミリーおよび UNC-5 ファミリーに対して結合しないことを明かした。また、胎生期の小脳板を用いた *in vitro* コラーゲンゲル培養系において、古典的ネトリン分子に見られる軸索誘引活性を持たないことを明かした。これらの結果にもとづいて、ネトリン G タンパクが古典的ネトリンタンパクと機能的に重複しないことを示唆した。ネトリン G1 および G2 遺伝子の発現を胎生期および、新生時期において *in situ hybridization* 法によって詳細に調べ、多くの前脳領域で相互排他的に発現をしていることを示した。ネトリン G1 と G2 間の機能的独立性を示唆した。次いで、それぞれに対する特異的抗体を作製し、タンパクの局在を調べたところ、ネトリン G1 は細胞体には少なく、軸索に多く局在することを明らかにした。抗ネトリン G1 抗体による免疫組織化学的解析は、同タンパクの視床皮質路および嗅索の軸索上への特に顕著な局在を明らかにした。本抗体を用いた研究により、視床から皮質投射と皮質から視床への投射が独立した経路を辿ることを初めて明らかにし、視床皮質路の形成機構に関する誤った既存の仮説を訂正した点は、高く評価できる。

視床と大脳皮質でそれぞれネトリン G1 と G2 遺伝子の発現が最も強いことと、視床と大脳皮質では相互に軸索を投射していることから、これらの部分を対象として *in vitro* での機能解析を行った。哺乳類培養細胞株において過剰発現させ精製したネトリン G タンパクを細胞培養皿に固相化し、その上に胎生期の視床、または大脳皮質より取り出した細胞を分散培養した。この実験により、固相化されたネトリン G1 および G2 タンパクともに、両組織由来の神経細胞に対して突起を伸長させる活性を有している事を明かした。一方、ネトリン G 分子が逆方向のシグナル伝達を介在する証拠の一つを提示した。細胞培養の結果と脳組織での遺伝子の発現特性およびタンパク質の分布の成績にもとづいて、ネトリン G 分子が大脳皮質と視床間の神経回路網形成機構において重要な役割を果たすことを示唆した。

本研究は、ネトリンファミリーが脊椎動物で多様化していることを明らかとし、遠距離作動性の誘引因子と考えられてき

た UNC-6/ネトリンファミリーの機能に新たな概念を提供したものである。神経科学，とりわけ神経発達科学の発展に多大の貢献を与えたと言える。よって，本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお，主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心とし，これに関連した研究分野について試問した結果，合格と認めた。