

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 西村 幸子

脳は外界の刺激情報を統合処理し、最終的に適切な行動として出力する器官であるが、その高度な機能発現の基盤は膨大な数の神経細胞からなる精密なネットワークである。近年、複数の軸索ガイド因子やそれらの受容体の同定、線虫やショウジョウバエを用いた遺伝学的解析によって、基本的な神経回路形成の分子基盤が急速に明らかとなってきた。しかし、より複雑な高等動物の中樞神経系を考えた場合、例えば個々の投射経路が特異的なシナプス結合を獲得する過程の分子機構についてはほとんど未解明である。脊椎動物では無脊椎動物に比べて軸索ガイド因子群の分子的多様性が報告されており、これは脊椎動物における神経機能の多様性を反映するものである。

そこで、本研究では脊椎動物の中樞神経系に限局して発現する膜結合型の **Netrin** 様分子である **Netrin-G1** と **Netrin-G2** が、神経系の複雑化に伴って進化してきた分子であると位置付け、脊椎動物に固有な機能的神経回路の獲得過程における役割を解明する目的で研究を行った。**Netrin-G** 分子群の生理機能を明らかにするため、マウス脳におけるタンパクの局在を明らかにし、その情報をもとに遺伝子欠損マウスを形態学的および行動学的に解析した。

第一章においては、**Netrin-G** タンパクに対する特異認識抗体を作製し、マウスの中樞神経系における両分子の分布および細胞内局在を明らかにした。まず成体脳において、免疫組織化学的手法によって **Netrin-G1** と **Netrin-G2** の分布を比較した。各タンパクは大腦皮質、梨状皮質、海馬などいずれの領域においても、重複しない特定の経路に選択的に分布した。また、**Netrin-G1** は主に皮質への知覚入力経路に、**Netrin-G2** は主に皮質（海馬）内の連絡経路に分布する特徴が見い出され、両分子は高い相同性を有するものの、機能的に分化していると考えられた。また、生後の発達を追って

Netrin-G1 タンパクの動態を検討した結果、(1) 発達中のニューロンでは軸索全体に渡る分布を示し、一方(2) 成体脳においては軸索束上の分布は消え、軸索終末領域に高濃度を集積することを見出した。この結果により、**Netrin-G** が発達段階によって異なる機能を担う可能性が示唆された。さらに、免疫電子顕微鏡法によって成体脳における超微形態レベルでの細胞内局在を検討し(1) **Netrin-G1, G2** の両分子が細胞膜表面に局在すること、(2) シナプス伝達部位のごく近傍に高頻度に存在することを見出した。以上の観察結果から、**Netrin-G** サブファミリータンパク群は細胞間認識分子として個々の投射経路の特異性決定に働く可能性が示唆された。

第二章では、**Netrin-G1** 及び **G2** 各々の遺伝子欠損マウスを作製し、それらの形態学的解析を行った。遺伝子欠損マウスを作製するにあたって、まずマウス *Ntng1* 及び *Ntng2* 遺伝子のゲノム構造を解析し(1) *Ntng1* はマウス第3染色体上に、*Ntng2* は第2染色体上にマップされること、(2) 両遺伝子は同様なエキソン-イントロン構造を有していることを明らかにした。続いて *Ntng1* 及び *Ntng2* 遺伝子の機能発現に必須なシグナル配列を含むエキソンを欠失させた変異マウスを作製した。いずれの変異マウスも成体まで生育し、脳の基本的な組織構築に顕著な異常は観察されなかった。**Netrin-G1** に関して、最も高い発現が見られる部位の一つである視床に着目し、トレーサー色素 Dil 標識や **Cytochrome oxidase** 染色によって視床-皮質投射を可視化し、軸索の発達状態を観察した。その結果 **Netrin-G1** 発現細胞自身の軸索投射、及びその可塑性には **Netrin-G1** の機能は必須でないことが示された。そこで次に **Netrin-Gs** タンパクが軸索終末に集積していることから、軸索の投射先(標的)である樹状突起への影響を検討した。トレーサー色素 **Biocytin** の注入によって海馬歯状回の顆粒細胞を単一ニューロンレベルで標識し、樹状突起の形態を観察した。その結果、*Ntng1*^{-/-}マウスでは野生型に比べ樹状突起の張り出しが広く、分枝の数も多いことが明らかとなった。これにより、軸索終末に分布する **Netrin-G1** は、未知の **Netrin-G** 受容体分子を介して樹状突起の発達を制御していることが示唆された。

さらに第三章では、上述の様な特定の神経回路の発達異常が高次脳機能に与える影

響を検討するため、両変異マウスを用いて行動学的解析を行った。変異マウスの行動特性を系統的、包括的に評価するため、複数の解析法を組み合わせたテストバッテリーを実施し、G1, G2 変異マウスの比較解析から、これらの変異マウスが各々特徴的な行動異常を示すことを明らかにした。Ntn1^{-/-}マウスは高架式十字迷路試験での異常行動、水泳能力の低下、また脳内ゲーティング機能の減弱や拘束ストレスに対する過剰反応が観察された。モリス水迷路テスト及び嗅覚弁別学習において Ntn1^{-/-}マウスの記憶能力は野生型と比較して正常であった。一方 Ntn2^{-/-}マウスはこれとは異なる表現型を示し、モリス水迷路テストにおいて空間の学習、記憶に成績の低下が見られた。これらの結果および第一章におけるタンパク分布の特徴から、Ntn1^{-/-}マウスは知覚情報の処理過程の不全、Ntn2^{-/-}マウスは学習や記憶など高次の統合機能の不全が想定された。

脊椎動物に特有な膜結合型 Netrin-G サブファミリー分子の発見は、高等動物における神経回路形成機構の多様性を反映するものである。本研究では、マウス Netrin-G1 と Netrin-G2 が脳のほぼ全ての領域に渡って、各々異なる投射経路に選択的に分布することを明らかにし、Netrin-G サブファミリーが脊椎動物においてさらに機能的に分化していることを示した。遺伝子欠損マウスの形態学的解析から Netrin-Gs は、従来の分泌型 Netrins で知られてきた神経回路形成初期における軸索ガイダンス機能（大まかな神経回路形成）と言うよりは、個々の回路の精緻化もしくは維持の過程に働くことを示唆する所見を導き出した。また、両変異マウスがそれぞれ特徴的な行動異常を示すことから、Netrin-G1 及び G2 が各々特定の回路において高次脳機能の発現に重要であることを示すと共に、統合失調症などに代表される神経発達障害性の精心疾患の動物モデルを提供しうる可能性を示した。以上のように本研究では、脊椎動物における機能的神経回路獲得機構の解明において新たな概念を裏付けるのに重要な知見をもたらしたものである。

従って、審査員一同は、当論文内容が農学博士の資格を有するとの結論に達した。