

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 矢口 邦雄

netrin-G1 と netrin-G2 は、神経軸索誘導因子 netrin のサブファミリー分子として近年同定された。古典的 netrin は系統発生的に保存されており、軸索誘導分子の分泌型化学誘因物質である。しかしながら netrin-Gs は古典的 netrin とは異なる特徴を持ち、脊椎動物に固有であり、グリコシルフォスファチジルイノシトールアンカー型膜蛋白質として軸索上に存在し、それぞれ独立した受容体を持つ。netrin-G1 と netrin-G2 は中枢神経系の異なる神経回路で相互排他的に発現する特徴を持つ。したがって、netrin-G1 と netrin-G2 遺伝子は異なる神経回路で独立した機能を果たすと考えられる。ヒト netrin-G における統合失調症、躁鬱病、Rett 症候群などの精神疾患に関与する可能性も示唆され、両遺伝子は脊椎動物における神経回路の複雑化と高次脳機能の獲得に関与した分子として注目される。Netrin-G1 と netrin-G2 の神経回路相互排他的発現のメカニズムを解明することは、高等動物の高次脳機能を解明する上で大きな役割を果たすと考えられる。したがって、この相互排他的発現を明らかとするため転写制御領域の解析を行った。

第一章

*Ntng1* と *Ntng2* の相互排他的な発現を詳細に調べるため、それぞれの翻訳開始点にレポーター遺伝子として *LacZ* を挿入したノックインマウスの発現パターン解析を行った。それによって、多くの領域でオーバーラップしない相互排他的な発現が観察された。特徴的な領域は視床と大脳皮質であり、視床では *Ntng1* が背側視床核で強く発現しているのに対し、*Ntng2* は手綱核、視床毛様核、視床前背側核で強く発現していた。大脳皮質においては、*Ntng1* は大脳皮質の 5 層で強く発現するのに対し、*Ntng2* は 2/3,4,6 層で強く発現していた。また、神経回路機能の観点から見た場合、*Ntng1* は背側視床、上丘、下丘、嗅球など情報のボトムアップ処理に関係する領域で強く発現していた。一方、*Ntng2* は皮質、海馬、手綱核、視床毛様核など、情報のトップダウン処理に関係する領域で強く発現していた。*Ntng1* と *Ntng2* は脊椎動物における高次脳機能の分子進化に重要な役割を果たしていると考えられる。本章の成績は、次章の参照データを提供するものである。

第二章

*Ntng1* と *Ntng2* の相互排他的発現の転写制御機構を調べるために、両遺伝子の翻訳開始点をカバーする約 200kb の長さの BAC クローンを手直し、レポーター遺伝子として *LacZ* を挿入したトランスジェニックマウスを作製し、発現パターンを解析した。その結果、両遺伝子ともに内在性遺

伝子の発現パターンを示す BAC クローンを同定した。

次に、両遺伝子のゲノム周辺領域についてマウスと脊椎動物種との比較ゲノム解析を行い、5つの進化的な高度保存領域を同定した。それらを指標として BAC クローンのゲノム配列を6つのセグメントに分け、それぞれの配列を欠失させたデリーションシリーズを作製し解析した。その結果、*Ntng2* については、それぞれのセグメントが異なった活性を有しており、特に転写開始点の上流 85kb から上流 45kb の領域に多くの広範な脳領域で活性を示す制御能を見いだした。さらに上流 95kb から上流 85kb の領域に、視床(内在性 *Ntng1* 発現領域)での発現を抑制するサイレンサーが存在する事が示唆された。*Ntng2* は上流 95kb から下流 100kb の約 200kb の領域に発現領域特異性を決定する転写制御領域が散在し、その組み合わせで発現が制御されていることが分かった。*Ntng1* についてもセグメントごとに異なった活性が検出された。特に上流 75kb から上流 60kb の領域に多くの脳領域で活性を示す制御能を見いだした。*Ntng1* は上流 75kb から下流 42kb の約 110kb に発現領域特異性を決定するエンハンサーが散在し、その組み合わせによって発現が制御されていることが分かった。

さらに、これらセグメントに存在する進化的な高度保存領域をヒートショック蛋白質のミニマムプロモーター付きの *LacZ* レポーター遺伝子につなげたコンストラクトを用いてトランスジェニックマウスを作製し、エンハンサー活性を調べた。その結果、*Ntng2* は上流 68kb に存在する大脳皮質 6 層を制御する約 2kb のエンハンサー配列を同定した。また、*Ntng1* は上流 65kb に背側視床核と大脳皮質を、上流 50kb に背側視床核を制御する約 2kb のエンハンサーを同定した。

これらの結果をまとめると、両遺伝子は上流と下流の広い範囲に散在する複数のエンハンサーによる発現の制御を受けている事が示唆される。また *Ntng2* 解析によって示唆される *Ntng1* 発現領域のサイレンサーの存在を考えると、*Ntng1* と *Ntng2* の相互排他的発現にサイレンサーを獲得したことの意味は大きい。また、両遺伝子ともに転写開始点から同程度の距離に強い発現活性を示す制御領域を持ち、さらにその領域内に相互排他的な発現の一つである皮質の発現を制御するエンハンサーが存在している。私は、*Ntng1* と *Ntng2* が転写制御領域も含めて重複し、さらに進化の過程で転写制御領域に生じた機能の獲得と欠失により、相互排他的発現能を獲得し、高等動物に高次脳機能を付与したとの考えを提唱する。

したがって、審査委員一同は、本人が博士(農学)の資格を十分に有するとの結論に達した。