

論文内容の要旨

申請者氏名 赤坂 啓子

神経接着分子は脳・神経系の発生過程において神経細胞またはグリア細胞や筋組織などの非神経細胞の細胞膜表面に存在し、神経細胞間あるいは神経細胞と他の種類の細胞、神経細胞と細胞外マトリックスとの相互作用を調節している。神経接着分子はその構造的特徴から幾つかのファミリーに大別されており、インテグリン、免疫グロブリン、カドヘリンなどのスーパーファミリーが知られている。免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)は、免疫グロブリン様(Ig)ドメインを一つ以上持つ分子群の総称である。IgSFにはIgドメインのみを持つ単純型やフィブロネクチンタイプIII様(FNIII)ドメインを含む複合型、その他の特徴的なドメインを合わせ持つ混合型がある。また細胞外領域に続いて膜貫通領域と細胞内領域を有するものとグリコシルフォスファチジルイノシトール(GPI)アンカーにより細胞膜に結合するものとに分けられる。IgSFに属する分子は神経系の発生過程で軸索あるいは樹状突起に発現し、同種親和性あるいは異種親和性の結合を介して神経突起伸長などの神経回路形成に働いている。IgSFは更に幾つかのサブグループに分類されている。6つのIgドメインと4つのFNIIIドメインを持つGPIアンカー型分子のコンタクチンと同じ構造を持つ分子群をコンタクチンサブグループという。コンタクチンサブグループの分子としてコンタクチン(F3/F11)、TAG-1(Axonin-1)、BIG-1、BIG-2、NB-2、NB-3の6種類がある。TAG-1は胎生期から発現が認められ、それ以外の分子は生後2週間の間に発現が増加する。また、このサブグループの分子はいずれも初代培養神経細胞の突起伸長を促進する作用を有している。このサブグループに属する分子の中で解析の進んでいるコンタクチンやTAG-1はIgSFの他の分子やその他の接着分子、細胞外マトリックス、あるいはイオンチャネルなどと相互作用して神経回路の形成において重要な役割を果たしていることなどが報告されている。また現在までに、IgSFに属する分子のうち幾つかの分子についてKOマウスが作製され、解析が進められている。例えばコンタクチンKOマウスは重度の運動機能障害を示し、生後18日で死亡することが報告されている。このようにIgSFに属する接着分子は神経系の発生過程において

欠かせない重要な分子である可能性が考えられている。本研究ではコンタクチンサブグループのなかでも NB-3 に着目して研究を行った。NB-3 は NB-2 と共に同定された分子でコンタクチンなどに比べ不明な部分が多い。そこで、NB-3 の生体内における機能を明らかにする目的で NB-3 ノックアウト(KO)マウスを作製し、解析した。本研究では NB-3 を欠損させるだけでなく、NB-3 プロモーター制御下で NB-3 の代わりに β -ガラクトシダーゼ (Lac Z) 遺伝子を発現するように組み換えた NB-3 遺伝子変異マウスを作製し、(1)NB-3 遺伝子発現部位の同定、(2)脳の発生過程における NB-3 遺伝子発現の推移、(3)脳神経系の構築及び高次機能における NB-3 遺伝子変異の影響について検討した。ホモ接合体マウスは正常に発育し、交配も可能であった。生後 7 日目と成体の野生型およびホモ接合体マウスの脳を用いて免疫組織化学的に解析した結果、脳神経系の構築において両者間で大きな差異は認められなかった。次にヘテロ接合体マウスを用いて Lac Z 染色を行い、NB-3 の発現分布を調べた。その結果、NB-3 は大脳では生後 2 週間目までが発現のピークで、小脳では生後 3 週間目以降に強く誘導されること、脳のかなり限局した神経核（副嗅球・大脳皮質第 2/3 層および第 5 層・梨状葉皮質・海馬・視床・視床下部・扁桃体の一部・下丘・赤核・下オリブ核・小脳・顔面神経核・青斑核など）に発現することが明らかとなった。この発現様式は同グループの他の分子とは異なっていた。また、小脳における NB-3 の発現は、生後早い時期には 9、10 葉のプルキンエ細胞層でのみ認められたが、一ヶ月齢以降ではそれに加え広範囲の内顆粒細胞層にも認められた。このように小脳の発生に伴い、NB-3 の発現は空間的に変化するという興味ある結果が得られた。NB-3 の発現が特に高かった小脳の 9、10 葉は前庭系との関連が強く眼球運動の制御やバランス感覚の調整などに関与している部位である。また、NB-3 の発現が高い時期は、小脳ではシナプス形成が終わり、その維持を行っている時期である。これらのことから、NB-3 の欠損が小脳の機能に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた為、行動解析による詳細な検討を行った。その結果、野生型に比べ体重や筋力に顕著な差が見られないにもかかわらず、ホモ接合体は rod walking や roto-rod といった実験においてバランスを保てないなど運動協調性に異常が認められた。以上の結果から NB-3 が機能的シナプスの形成や維持あるいは活動依存性に起こるシナプスの再構築などに関与する可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 赤坂啓子

神経接着分子は、神経系の形成過程において、神経細胞間、あるいは神経細胞と非神経細胞や細胞外マトリックスとの間の相互作用を制御している分子群である。神経接着分子は、その構造の類似性から、インテグリン、免疫グロブリン、カドヘリンなどのスーパーファミリーに分類されている。免疫グロブリンスーパーファミリーもいくつかのサブグループに分けられるが、GPI アンカー型のコンタクチンサブグループには、コンタクチン(F3/F11), TAG-1(Axonin-1), BIG-1, BIG-2, NB-2, NB-3 の6種類が知られている。本論文は、この神経接着分子の一つ、NB-1の発現領域および機能を明らかにするためノックアウトマウスを作製し、解析を行なったものである。

NB-3 遺伝子の一部を lac-Z 遺伝子に置き換え、NB-3 プロモーターの制御下で β -ガラクトシダーゼを発現する遺伝子変異マウスヘテロ接合体マウスを用いた発現領域の解析から、NB-3 遺伝子は、大脳では生後2週令までが発現のピークであるが、小脳では生後3週以降に強く誘導されること、また脳のかなり限局した神経核（副嗅球、大脳皮質第2/3層および第5層、梨状葉皮質、海馬、視床、視床下部、扁桃体の一部、下丘、赤核、下オリーブ核、小脳、顔面神経核、青斑核など）に発現することが明らかになった。この発現様式は、コンタクチングループの他の分子とは異なっていた。また、小脳における NB-3 の発現は、生後早い時期には、9, 10葉のプルキンエ細胞層でのみ認められたが、一ヶ月令以降ではそれに加え広範囲の内顆粒細胞層にも認められた。このように小脳の発達に伴い、NB-3 の発現は空間的に変化するという興味ある結果が得られた。NB-3 の発現が特に高かった小脳の9, 10葉は前庭系との関連が強く、眼球運動の制御やバランス感覚の調整などに関与している部位である。また、NB-3 の発現が高い時期は、小脳ではシナプス形成が終わり、その維持を行なっている時期である。これらのことから、NB-3 の欠損が小脳の機能に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられたため、NB-3 ノックアウトホモ接合体の詳細な行動解析を行なった。NB-3 ノックアウトホモ個体は正常に発育し、交配も可能であり、野生型に比べ体重や筋力に顕著な差が見られないにもかかわらず、rod walking や roto-rod といった実験においてバランスを保てないなど運動協調性に異常が認められた。以上の結果から NB-3 が機能的シナプスの形成や維持、あるいは活動依存的に起こる、シナプスの再構築などに関与する可能性が示唆された。

以上のように、本論文は神経接着分子 NB-3 の高次神経機能における役割を明かにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。