

平成23年5月31日現在

機関番号： 82401  
 研究種目： 基盤研究(B)  
 研究期間： 2008～2010  
 課題番号： 20300116  
 研究課題名（和文）  
 Netrin-G/NGL相互作用による情報の統合機構の解析  
 研究課題名（英文） Netrin-G/NGL interaction for integrating neuronal information  
 研究代表者  
 系原 重美（ITO HARA SHIGEYOSHI）  
 独立行政法人理化学研究所・行動遺伝学技術開発チーム・チームリーダー  
 研究者番号： 60252524

## 研究成果の概要（和文）：

netrin-G1 および netrin-G2 は重複しない神経回路の軸索に選択的に発現し、投射先の樹状突起内に特異的リガンド NGL1 および NGL2 を介して、神経回路特異的区画を形成する。netrin-G と NGL は夫々シナプス前膜および後膜に局在する。ノックアウトマウスの電気生理学および行動学的解析結果は、netrin-G/NGL 相互作用がシナプス機能の完全性に不可欠であり、情報統合に重要な役割を担う事を明らかにした。さらに、これらの能力の基礎となる両遺伝子の相互排他的発現特性の獲得機序に考察を加えた。

## 研究成果の概要（英文）：

netrin-G1 and netrin-G2 are expressed on axons of distinct neuronal circuits and form functionally distinct subdomains on dendrites via interaction with their specific ligands, NGL-1 and NGL-2, at synapses. Electrophysiologic and behavioral studies on mice lacking either netrin-G1 or netrin-G2 revealed that netrin-G/NGL interaction had important roles for maintaining the integrity of synaptic function and plasticity. Moreover, we provided evidence that the differential expression patterns of duplicated netrin-G1 and netrin-G2 genes were acquired by “special subfunction partitioning”.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：netrin-G1, netrin-G2, NGL1, NGL2, 変異マウス、シナプス伝達、可塑性、認知機能

### 1. 研究開始当初の背景

高等脊椎動物の脳が担う高次脳機能は、複雑ながらも高度に統制された神経回路が織りなす情報統合の結果である。その機構の破綻は、ヒトにおける多様な精神疾患の基礎となる。したがって、神経回路の特異性を決定する分子・細胞機構の理解は、基礎神経科学のみならず医学の発展に不可欠である。このような背景から、我々はシナプス機能および可塑性に関わる膜蛋白質コード遺伝子の網羅的探索を行い、脊椎動物に固有の膜分子 **netrin-G1** および **netrin-G2** を同定した。これらは脊椎動物門で遺伝子重複によって出現したと考えられるが、脳の相互排他的領域（回路）で発現する特徴を持つ。さらに、これらの膜蛋白質が夫々固有の膜蛋白質リガンド、**NGL1** および **NGL2** と相互排他的に結合する事を明らかにした。これらの特性の結果、経細胞性機構により単一細胞内にさえ神経回路特異性を付与する機構が存在する事が示された。これらの結果は、高等脊椎動物の高次脳機能の獲得に **netrin-G** と **NGL** の分子進化が大きく貢献した事を示唆している。しかしながら、それらの脳機能における機能および作用機構など、不明の点は多い。

### 2. 研究の目的

相互排他的発現パターンを示す **netrin-G1** と **netrin-G2** の分子進化がどのようにしてなされ、高等脊椎動物の脳機能の獲得で果たした意義を明らかにし、さらのその分子機構を明らかにする事を目的とした。特に、**netrin-Gs/NGLs** の分子進化の本質は、高度な認知機能の基礎となる“注意”の発達に寄与したのではないかと仮説のもと、その検証を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) **netrin-G1** および **netrin-G2** 遺伝子座に **nLacZ** (核移行性 **LacZ**) をノックインしたマウスおよびそれらの遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作成し、これらを相互に交配する事により、**nLacZ** の発現を指標とし、相互排他的発現に蛋白質を介したフィードバック機構に関わる可能性を検証した。

(2) **netrin-G1** および **netrin-G2** 遺伝子の BAC クローンを得て、相同性組換え機構で翻訳開始点直下に **nLacZ** を導入したベクターを作成し、さらに一連の配列欠損シリーズを作成し、トランスジェニックマウスを作成した。あるいはエンハンサー候補領域の DNA 断片を外来性最小プロモーターと組み合わせてト

ランスジェニックマウスを作成して相互排他性を制御するシス領域を解析した。

(3) 超薄切片作成後、抗 **netrin-G1**, 抗 **netrin-G2**, 抗 **NGL1**, 抗 **NGL2** 抗体による免疫染色を施し、透過型電子顕微鏡で観察した。また、透過電子顕微鏡により、海馬の各層 (CA1 放射状層、CA1 網状分子層、歯状回外側分子層および歯状回中間分子層) のシナプス密度を定量的に解析した。

(4) レーザーマイクロダイセクション法で **Netrin-G1** および **Netrin-G2** 欠損変異マウスの CA1 放射状層, CA1 網状分子層を切り出し、ウエスタンブロット法で **NGL1**, **NGL2**, およびその他シナプス分子を定量的に解析した。

(5) ネットリン G2 の発現パターンとの類似性を示す **Cdk12** 遺伝子欠損変異マウスに網羅的行動解析を課した。行動解析パラダイムの評価とした。

(6) ネットリン G1 欠損変異マウスおよびネットリン G2 欠損変異マウスを作成し、これらを網羅的な行動解析課題に課し、両変異マウスの行動学的異常の特徴を抽出した。特に、相互排他的発現特性との観点から評価した。

(7) 野生型および遺伝子欠損変異マウスの新鮮海馬切片を作成し、シャープファー繊維-CA1 シナプス、貫通繊維-CA1 シナプス、外側貫通繊維-歯状回シナプス、内側貫通繊維-歯状回シナプスの伝達特性および可塑性を解析した。また、薬理的負荷による特性変化を解析した。多くの解析は細胞外電位解析法によって行い、一部の実験 (AMPA 受容体/NMDA 受容体比) についてはホールセルパッチクランプ法で実施した。

### 4. 研究成果

(1) **netrin-G1** および **netrin-G2** 遺伝子座に **nLacZ** をノックインしたマウスは、両遺伝子の発現を単一細胞の解像度でモニターするのに効果的であった。相互排他的発現制御に機能性蛋白質の発現に伴うフィードバック機構が存在するとの仮説を検証するため、交配によりノックインアリル

(図1) を **netrin-G1-KO** もしくは **netrin-G2-KO** バックグラウンドに導入した。その結果、**nLacZ** の発現に系統間の差異は認められず、この可能性は否定された。

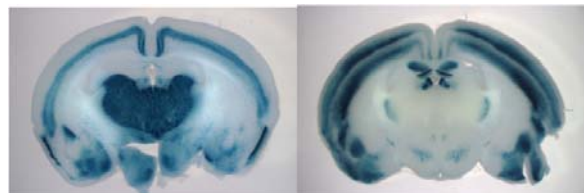


図1 ノックインマウスに観察される相互排他的発現パターン：(左) **netrin-G1-nLacZ**、(右) **netrin-G2-nLacZ**

(2) 内在性遺伝子の発現パターンを最大限反映する BAC クローンを同定後、これらを用いて一連の欠損シリーズを作成してトランスジェニック法で転写制御領域を解析した結果、netrin-G1 および netrin-G2 遺伝子とも、転写を正あるいは負に制御するシス配列が転写開始点を挟む数十 Kb に分布する事を明らかにした。また、インヴィボエンハンサー解析により、両遺伝子とも上流約 60kb の位置に皮質もしくは視床で働くエンハンサーの存在を同定した。これらエンハンサーは、種間で高度に保存されたゲノム領域に存在した。これらの結果から、夫々のシス配列は特有の脳領域での発現に関わり、その組み合わせの結果が相互排他性を決定するとの結論を得た (図 2)。

最も原始的脊椎動物とされる八つ目ウナギでは単一の netrin-G 遺伝子の存在が確認され、その他の脊椎動物では netrin-G1 と netrin-G2 の存在が確認されている。これらの遺伝子は、脊椎動物の進化の過程で生じた全ゲノム重複に伴って形成されたと考えられ、その後蓄積した転写調節領域における変異の蓄積によって、相互排他的発現特性を獲得した事が示唆される。

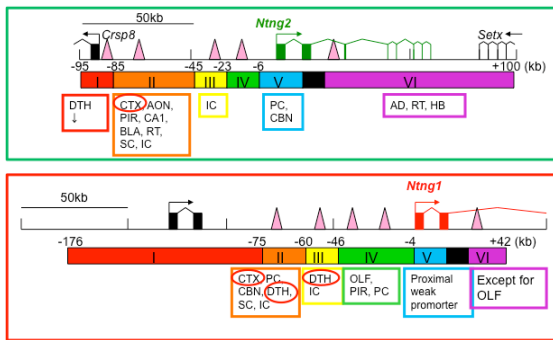


図 2 netrin-G1 および netrin-G2 遺伝子のゲノム構造と転写調節配列の広範な分布を示す。三角は進化上、高度に保存された領域を示す。

(3) netrin-G が軸索に選択的に分布し、NGL が樹状突起に分布する事は既に明らかにしていた。しかし、それらの詳細な分布については不明であった。コンフォーカル顕微鏡解析に加え、ポストエンベディング法で局在を観察した。反応の特異性は、遺伝子欠損変異マウスの切片における非反応性で確認した。その結果、netrin-G1 と netrin-G2 は独立した回路のシナプス前膜側に、NGL1 と NGL2 は同様に独立した回路のシナプス後膜側に分布する事を明らかとした (図 3)。

したがって、netrin-G/NGL 相互作用が直接シナプス機能を制御する証拠の一つが示された。

シナプス密度の解析によると、netrin-G1-K0 マウスの歯状回外側分子層で

のみシナプス密度の低下が認められた。この層は、netrin-G1 依存的回路を形成している。Netrin-G1-K0 マウスのその他の回路および netrin-G2-K0 マウスで有意な異常は認めなかった。

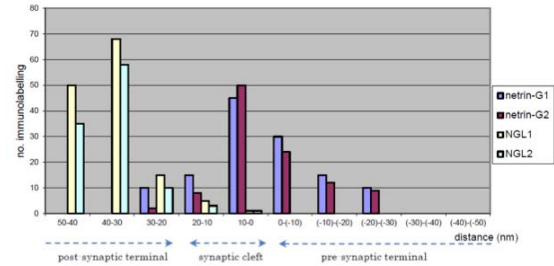


図 3 免疫シグナルの相対的度数分布を示す。netrin-G1/G2 がシナプス前膜側に、NGL1/2 がシナプス後膜側に偏って分布する事を示している。

(4) これまでの免疫染色実験により、netrin-G 欠損下で、樹状突起上の特異的 NGL が樹状突起表面全域に拡散する事が示されている。しかし、その結果は定量的ではない。また、その拡散が他のシナプス分子に及ぼす影響については明らかでない。したがって、海馬 CA1 の放線状層および網状分子層をマイクロダイセクション法で切り出し、定量的ウエスタンブロット法で解析した。その結果、免疫染色の結果と良く一致し、野生型マウスの放線状層では netrin-G2 の濃度が高く、網状分子層では netrin-G1 の濃度が高い。Netrin-G1-K0 マウスでは、netrin-G1 の濃度が放線状層と網状分子層で平衡化し、netrin-G2-K0 マウスでは、netrin-G2 の濃度が放線状層と網状分子層で平衡化している事が明らかとなった。GluR1, NR1, PSD95 などに優位な変動は検出されなかった。

(5) Cdk12 遺伝子は cdc2 に類似したセリンスレオニンキナーゼであるが、netrin-G2 と発現領域の多くが重複する特徴を持つ。netrin-G2-K0 マウスの解析において良い比較対象であり、網羅的行動解析を実施した。このマウスは海馬依存的行動課題、すなわち文脈依存の条件付けおよび空間学習に不全を示した。

(6) netrin-G1-K0 および netrin-G2-K0 マウスについて網羅的解析を繰り返し、信頼度の高い行動解析データを集積した。その結果、両変異マウスは、多様な行動学的異常を示すが、重複性は認めなかった。この結果は、両蛋白質が独立した神経回路で発現している事と良く一致した。netrin-G1-K0 マウスは知覚情報処理の初期過程に不全を示すと要約されるのに対して、netrin-G2-K0 マウスは短期および長期記憶および情動に顕著な異常を示す事が明らかとなった。注意の観点から評価するため、5 選択反応時間課題を課した。その結果、両変異マウスとも、衝動性を示唆する行動特性を示した。しかしながら、その衝動性は両変異マウス間で質的に大きく異なる

る事が示された。netrin-G1-KO マウスはタスクが容易な段階から衝動的行動を示すのに対し、netrin-G2-KO マウスはタスクの難易度が高まって始めて衝動的行動を示すなど、大きな差異を示した (図4)。衝動的制御機構の多様性を示唆している。また、netrin-G2-KO マウスは、この課題の手続き学習に遅延を示し、八方迷路による作業記憶課題で顕著な異常を示した。このマウスは5選択反応時間課題で顕著な空間注意不全を示さないものの、注意の異なった側面に異常を持つと考えられた。以上の結果は、netrin-G1 および netrin-G2 を指標とした神経回路の解析が、高次脳機能を反映する行動の制御回路の機能解析に有効である事を示唆した。

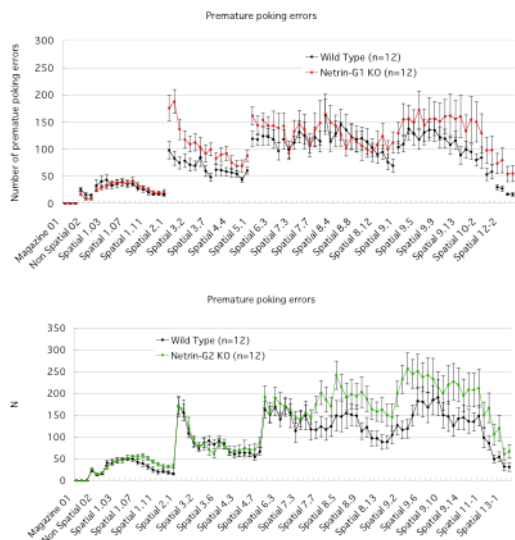


図4 5 選択反応時間課題における衝動性の指標としての未熟反応：横軸にトレーニングセッションを、縦軸に未熟反応の回数を示す。

(7)海馬回路はnetrin-G1 および netrin-G2 が相互排他的に発現し夫々の組織学的識別が容易であるので、netrin-G1 および netrin-G2 がシナプス伝達特性および短期・長期可塑性に及ぼす影響を評価する上で大きな利点を持っている。したがって、海馬回路に焦点を絞り、シャーファー繊維・CA1(SC-CA1)、貫通繊維・CA1(TA-CA1)、外側貫通繊維・歯状回(LPP-DG)、内側貫通繊維・歯状回(MPP-DG)のシナプス機能を解析した。インプット/アウトプット比はnetrin-G2-KO マウスのMPP-DG回路でのみ減弱を観察した。この回路では、ペア刺激により短期抑制が生じるが、netrin-G2-KO マウスでは、その減弱を観察した。シナプス伝達の基本特性に異常を示さないSC-CA1 および TA-CA1 について、シータバースト刺激による長期増強を解析した。netrin-G1-KO マウスのTA-CA1 シナプスにお

いては、長期増強に減弱を認め、netrin-G2-KO マウスのSC-CA1 シナプスにおいては逆に長期増強の亢進を認めた(図5)。これらの異常は刺激中および刺激直後から観察された。NMDA受容体拮抗剤存在下でのシータバースト後増強、テタヌ刺激後増強についても、netrin-G1-KO マウスのTA-CA1 シナプスでは減弱が認められ、netrin-G2-KO マウスのSC-CA1 シナプスでは亢進が認められた。これらの結果は、長期可塑性の異常は、主としてシナプス前膜側における機構で生じている事を示唆している。一方、当初の予想に反し、NMDA受容体の機能異常は検出されなかった。したがって、電気生理学的にもnetrin-G1 および netrin-G2 による回路特異的機能が明らかとなった。その制御機能は、回路により多様である事も明らかになった。

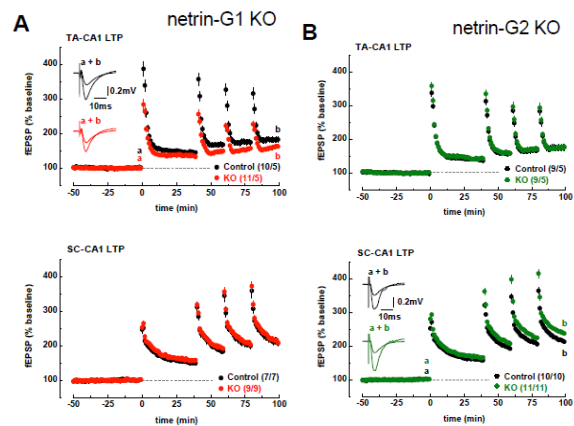


図5 回路特異的長期増強の異常：netrin-G1-KO マウスではSC-CA1 特異的に長期増強の減弱が、netrin-G2-KO マウスではSC-CA1 特異的に長期増強の亢進が認められた。

まとめ：netrin-G1 および netrin-G2 遺伝子の分子進化は高等脊椎動物が高次脳機能を獲得した過程で必須の役割を演じた。注意もしくは注意関連能力の発達との関連に興味を持たれる。netrin-G1 および netrin-G2 を神経回路の分子指標として、また、回路特異的機能実行分子として利用した神経回路の機能解剖は、高等脊椎動物の高次脳機能の生物学的理解に大いに貢献すると期待される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①Gomi H, Sassa T, Thompson RF, Itohara S. Involvement of cyclin-dependent kinase-like 2 in cognitive function required for contextual and spatial learning in mice. *Front. Behav. Neurosci.*, 4, 2010 (査読有り)

〔学会発表〕(計3件)

①矢口邦雄、西村幸子、糸原重美 *Ntng1* と *Ntng2* 遺伝子のシス調節エレメントの進化的変化は脊椎動物における高次脳機能と神経回路の精緻化に重要である

BMB2010(第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学大会 合同大会) 2010年12月7日神戸ポートアイランド

②糸原重美 脊椎動物特異的経シナプス分子 “netrin-G/NGL” の獲得と高次脳機能の発達

第一回脳表現型の分子メカニズム研究会プログラム 2010年10月23日大阪大学

③矢口邦雄、西村幸子、糸原重美 *Ntng1* と *Ntng2* のシス調節エレメントの進化的変化は、脊椎動物における高次脳機能と神経回路の精緻化に重要な役割を持つ

Neuro2010 (第33回日本神経科学大会 第53回日本神経化学学会大会 第20回日本神経回路学会大会 合同大会) 2010年9月2日神戸コンベンションセンター

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

糸原 重美 (ITO HARA SHIGEYOSHI)

独立行政法人理化学研究所・行動遺伝学技術開発チーム・チームリーダー

60252524

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

松川 浩 (MATSUKAWA HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・行動遺伝学技術開発チーム・リサーチアソシエイト

20392128

西村 幸子 (AKIYOSHI-NISHIMURA SACHIKO)

独立行政法人理化学研究所・行動遺伝学技術開発チーム・研究員

10373341

矢口 邦雄 (YAGUCHI KUNIO)

独立行政法人理化学研究所・行動遺伝学技術開発チーム・研究員

60553641

張 琪 (ZHANG QI)

独立行政法人理化学研究所・行動遺伝学技術開発チーム・研究員

20525604

岩里 琢治 (IWASATO TAKUJI)

独立行政法人理化学研究所・行動遺伝学技術開発チーム・副チームリーダー

00311332

(H20-H21)