

氏 名 篠 崎 幸 喜

学位（専攻分野） 博士(学術)

学 位 記 番 号 総研大甲第414号

学位授与の日付 平成11年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 A novel gene, norbin, increased by treatment of
tetraethylammonium in the rat hippocampal slice and
accompanied with neurite-outgrowth in Neuro 2a
cells

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 池 中 一 裕
教 授 小 幡 邦 彦
助 教 授 森 泰 生
教 授 加 藤 泰 治 (名古屋市立大学)

Selective expression of various genes occurs in the process of development, maintenance, injury, and death of unicellular as well as complex organisms, and proteins encoded by such genes plays an essential role(s) at each steps in such biological activities. Specifically expressed genes are usually identified by differential cloning, such as subtraction cloning. In this study, he has applied subtraction cloning to study the genes, whose expression is specifically accompanied by long-lasting changes in brain functions.

Synaptic plasticity is one of the phenomena directly related to learning and memory in neural pathways. It can be considered to be re-differentiation of neurons in the sense that it is often accompanied with reformation of neuronal circuit. For example, it was reported that synaptic reorganization in hippocampus was induced by kindling, a model of synaptic plasticity, and that sprouting of mossy fiber in hippocampus occurred in long-term potentiation (LTP), an another model of synaptic plasticity. On the other hand, some genes which are related to the formation of neuronal circuit (for example, neurotrophin-3, heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM), GAP-43) are known to be related to LTP, in addition to neuronal differentiation. Hence it is considered to be an effective strategy to understand synaptic plasticity to find and analyze the genes related to both synaptic plasticity, such as LTP, and neuronal differentiation.

LTP is a phenomenon representing synaptic plasticity and has been extensively studied as a model of learning and memory. The electric high frequent stimulation of presynaptic cells results in persistent potentiation of response of post synaptic cells (tetanic LTP). Although, during or immediately after the stimulation, the specific gene expression is considered to be activated and to play a role(s) in the maintenance of LTP, little is known about the molecular mechanism. LTP can also be induced by a bath application of tetraethylammonium (TEA), a K^+ channel blocker, to the rat hippocampal slices in a similar mechanism to tetanic LTP (TEA-LTP). In contrast to tetanic LTP, which is considered to occur in a limited number of neurons around the electrode, TEA-LTP are considered to involve many neurons. This enables us to find genes related to this phenomenon by the subtraction cloning.

They screened for new genes related to TEA-LTP by subtraction between the mRNA of a rat whole brain and that of the TEA-treated slices. During this screening, a novel gene, named norbin, whose mRNA was increased about 1 hr after the TEA-treatment, was identified. It was about 5 kb in length and had no significant homology with known genes. The predicted protein sequence of norbin consisted of 729 amino acids.

Immunoblotting of rat tissues with the antibody against norbin revealed a band of about 80 kDa, which corresponded to the calculated molecular weight of 78,894

Da and was specifically detected in neural tissues. The double staining of the rat brain using anti-GFAP antibody and *in situ* hybridization of norbin, or anti-CNPase antibody and anti-norbin antibody revealed that norbin was mainly expressed in neurons. Immunostaining of a rat brain using anti-norbin antibody revealed that norbin was distributed throughout the brain. In the cerebral cortex, the strong signal was observed in neurons of the 2nd- 3rd layers. In the cerebellum, Purkinje cells and granule cells were stained well. In the hippocampus, pyramidal cells and granule cells were strongly stained. Norbin was localized in the somata except for nuclei and dendrites of neurons. The subcellular fractionation study revealed that norbin is a cytosolic protein.

Transfection of norbin cDNA facilitated process-outgrowth of a neuroblastoma cell line, Neuro 2a cells. In the case of a fibroblast cell line, COS-1 cells, no effect on their morphology was observed. These results suggest the selective function of norbin in neural tissues.

Immunoblotting of the developing rat showed that faint expression was observed in the whole body on embryonic day (E) 10.5 and in the brain on E12.5. The expression in the brain gradually increased towards the juvenile stage (postnatal day 7-28) and decreased thereafter in adult stage, except for the hippocampus, where the expression increased gradually until adult stage. Immunostaining of E14.5 rat revealed that norbin was expressed in neurons in the cortical plate of the telencephalon, but not in the ventricular zone, suggesting that it might be expressed in neurons which migrated from the ventricular zone and undergone terminal differentiation. The double staining of the developing Purkinje cells using anti-calbindin antibody and anti-norbin antibody revealed that it was distributed throughout the dendrites and somata of the cells, in particular, in their growing dendritic trees, suggesting the involvement of norbin in the dendritic outgrowth.

Since norbin was expressed from the early neural developmental stage to adult, localized in the somatodendritic regions of neurons, and showed a neurite-outgrowth-facilitating activity, it might be involved in the neural differentiation and plasticity, by affecting the somatodendritic functions, in particular, contributing to the modification of neural network.

論文の審査結果の要旨

発生、維持、死など様々な生命活動において、選択的な遺伝子発現が生じており、その産物である蛋白質はそれらの生命活動において必須である。従って、活動依存的に発現される遺伝子を同定・解析することは、生命活動を分子レベルで理解する上で重要である。本研究は、記憶・学習の物質的実体と考えられている神経の可塑性的変化に伴って発現される新規の遺伝子の同定・解析を試みたものである。

神経可塑性の代表的なモデルとしてラット海馬スライスの LTP（長期増強）が知られている。これは、シナプス前細胞を反復電気刺激するとシナプス後細胞の反応性が持続的に増加する現象である。この現象は海馬スライスを TEA（カリウムチャンネルの阻害剤）処理することによっても生じることが知られている。LTP には遺伝子発現が必須であることが知られているが、その分子機構はよく分かっていない。本研究では、海馬スライスを TEA 処理することで発現が増加する新規の遺伝子 *norbin* を差分クローニング法により同定した。

差分法で得られた *norbin* の断片をプローブとして、ラットの cDNA ライブラリーから *norbin* の長鎖クローンを得て、全アミノ酸配列を決定した。ラット組織のノーザンブロットィングを行うと中枢神経系で発現が見られた。mRNA は約 5 kb で単一のバンドであった。ラット脳の *in situ* hybridization を行った結果、脳全体で発現がみられた。特に、大脳皮質、海馬、小脳のニューロンで強い発現が見られた。特異抗体を作成し、ラット組織のイムノブロットィングを行ったところ、中枢神経系、末梢神経系ともに発現されていた。その分子量は約 80 kDa であった。ラット脳の免疫染色を行ったところ、大脳では第 2, 3 層のニューロンに、海馬では錐体細胞に、歯状回では顆粒細胞に、小脳ではプルキンエ細胞に特に強い発現が見られた。いずれの細胞においても、樹状突起および細胞体に分布していた。核への分布は見られなかった。また、ラット大脳皮質の細胞分画を行ったところ、そのほとんどが可溶性細胞質画分に回収された。以上の結果から、*norbin* は神経特異的な可溶性細胞質蛋白質であることが示された。

また、神経芽細胞である Neuro 2a 細胞に *norbin* を遺伝子導入した結果、野生型に比べ突起伸長の促進が観察されたことから、神経回路網の再構成、すなわち可塑性になんらかの関与をしている可能性が示唆された。また、その発現はラットの胎児期第 10 日目で既に発現されていた。胎児期第 14 日目の脳では、cortical plate に発現がみられ、分化開始後のニューロンに発現することが示された。神経芽細胞である Neuro 2a 細胞に *norbin* を遺伝子導入した結果、野生型に比べ突起伸長の促進が観察された。小脳プルキンエ細胞の分化過程における発現を免疫染色にて観察すると、樹状突起の伸展と相関的に発現の上昇がみられ、樹状突起伸展への関与が示唆された。以上の結果から、*norbin* は神経の分化にも関与している可能性が示唆された。

神経の可塑性は神経回路網の再構成を伴うことが報告されてきており、この意味で神経の新たな分化であると思なすことができる。実際、神経の発生・分化に関与することが知られている遺伝子のうち、神経可塑性に伴って発現が変化する遺伝子の存在も知られつつある。本研究にて同定された新規の遺伝子 *norbin* はそれらの遺伝子と同様に神経の分化・可塑性に関与している可能性がある。また、この *norbin* は既知の遺伝子とは全くホ

モロジーのない新規の遺伝子であり、細胞生物学上、新たな領域を開拓している可能性もある。

以上の研究は、神経系の分化・可塑性の分子機構を探究するもので、神経科学、細胞生物学において価値あるものと判定した。

また、研究成果は既に1報国際誌に発表されており、また、新たに国際誌に投稿準備中である。さらに、修士課程、および、本博士課程では他の分野においても筆頭著者として英文原著論文を2報発表していることから、英語、論文作成能力は十分であると判定した。関連事項についての諮問にも的確な解答が得られたことから、生理科学において十分な学識を有すると判定した。

学問的背景や関連分野の研究動向についての口頭試問を行ったが、いずれに対する応答も満足すべきものであった。本論文は英語で書かれており、また申請者を筆頭著者とする3編の英文論文が既に刊行されていることから、英語力も十分なものと判定した。

以上、総合的に判断し、学位を取得するに足る水準に十分達しているものと判断した。