

論文の内容の要旨

Biological significance of mammalian-specific homopolymeric amino acid repeats in POU3F2: its contribution to brain development and function

(POU3F2 の哺乳類特異的単一アミノ酸リピートが有する生物学的意義: 脳の発生と機能への寄与)

氏名 橋詰 晃一

序論

一種類のアミノ酸が連続して並ぶリピート配列(単一アミノ酸リピート)は、真核生物ゲノムのコーディング領域でよくみられる構造であり、生体にとって機能性を有する配列だと考えられている。単一アミノ酸リピートは、しばしば転写因子にみられ、その活性やタンパク質間相互作用に影響を及ぼすことが知られている。また、近年は単一アミノ酸リピートと表現型の関連が報告されており、リピートの分布やサイズに種・分類群間で多様性がみられることから、リピートが表現型の進化に寄与することが提唱されている。一方で、単一アミノ酸リピートの生物学的・進化学的意義について、生体を用いた実験的手法による研究はほとんど行われていない。そこで、私は単一アミノ酸リピートを内含する遺伝子に着目し、そのリピートが生体で果たす役割について検証を行った。

中枢神経系で発現する転写因子 POU3F2 (BRN2, N-OCT3) は単一アミノ酸リピートを含む遺伝子の一つであり、神経幹細胞の分化や大脳皮質層構造の形成に関与する。哺乳類の POU3F2 には3種類の単一アミノ酸リピートが含まれている(図1)が、哺乳類以外の脊椎動物の POU3F2 にはこれらリピートは存在しないか、あるいは短いリピートのみが存在する。これら単一アミノ酸リピートは、脊椎動物の進化の過程で POU3F2 に挿入されたと考えられている。

本研究では、POU3F2 に含まれる哺乳類特異的な単一アミノ酸リピートの、機能的役割ならびに表現型レベルでの役割を明らかにすることを目的とした。そこで、リピートを全て欠失した *Pou3f2* を本来の *Pou3f2* と置き換えたノックインマウス(以下、リピート欠失型マウス; 図1)を用いて、このマウスの脳の機能と発生にみられる影響を調べた。

結果

1. POU3F2 の単一アミノ酸リピートは大脳皮質のアストロサイト産生に寄与する

POU3F2 の転写因子としての機能がリピートの有無で変化するか調べるため、*in vitro* の系で実

験を行った。野生型 *Pou3f2* とリピート欠失型 *Pou3f2* それぞれを Gal4-DNA 結合ドメインに融合させ、これらの発現ベクターと Gal4 結合サイトを含むレポータープラスミドを Neuro-2a 細胞に導入した。luciferase assay により転写活性を測定した結果、リピート欠失型 *Pou3f2* は野生型 *Pou3f2* よりも高い luciferase 転写活性を示した。このことは、単一アミノ酸リピートが *Pou3f2* の転写活性化能に対して抑制的に働くことを示唆する。

POU3F2 は、大脳皮質の発生において重要な役割を果たすことが知られている。そこで POU3F2 の単一アミノ酸リピートの役割を探るため、大脳皮質に着目して解析を行った。isotropic fractionator 法を用いて脳細胞数を計測したところ、リピート欠失型マウスの大脳皮質ではグリア細胞が 20%ほど減少していた。そこで、グリア細胞の一種であるアストロサイトの産生に着目した。免疫組織化学的方法により、生後の大脳皮質で S100 β +アストロサイトを、胎生期の皮質板で GLAST+アストロサイト前駆細胞を、それぞれ定量した。結果、S100 β +細胞と GLAST+細胞は、それぞれ 20%と 40%ほどリピート欠失型マウスで減少していた。これらの結果は、*Pou3f2* のリピートはアストロサイト産生に寄与することを示している。次に、ニューロンへの運命決定がなされた前駆細胞である intermediate progenitors (IPs)の定量を行った。アストロサイト産生期 (E17.5) の大脳皮質において、リピート欠失型マウスでは TBR2+IPs が 35%ほど増加していた。従って、リピート欠失型マウスでは神経幹・前駆細胞の分化に異常が生じている可能性が示唆される。これを検証するため、E16.5 の増殖細胞を BrdU で標識し、48 時間後に大脳皮質における BrdU+GLAST+細胞と BrdU+NeuN+細胞の計測を行った。前者はアストロサイトに分化する細胞を、後者はニューロンへ分化する細胞を示す。結果、リピート欠失型マウスの大脳皮質において BrdU+GLAST+細胞の割合は減少し、BrdU+NeuN+細胞の割合は増加していた。すなわち、アストロサイト産生期のリピート欠失型マウスでは、神経幹・前駆細胞のアストロサイトへの分化が抑制され、ニューロンへの分化が促進されていることが示唆される。

2. POU3F2 の単一アミノ酸リピートは認識・記憶機能に寄与する

POU3F2 は認知機能に関連することが報告されている。また、大脳皮質のアストロサイトは記憶機能に寄与することが知られている。そこで、認識・記憶機能を評価する object recognition test と object location test の 2 つの行動テストを、野生型マウスとリピート欠失型マウスで比較した。結果、リピート欠失型マウスは両テストで低い recognition index を示し、認識・記憶における欠損を示した。

認識・記憶機能と関連する脳領域として、大脳皮質と海馬が知られている。これら領域における組織学的解析では、遺伝子型間の違いは観察されなかった。そこで、成体海馬におけるニューロン新生について調べた。成体以降も海馬で新生するニューロンは、記憶・認識において重要であることが知られている。海馬において、未成熟なニューロンのマーカーである DCX を発現している細胞を定量したところ、リピート欠失型マウスで減少がみられた。このことは、海馬でつくられるニュー

ーロン数が減少していることを示唆する。さらに、神経突起形態の解析から、リピート欠失型マウスでは海馬における神経幹細胞の分化に異常が生じていることが明らかになった。

以上の結果より、リピート欠失型マウスでは、認識・記憶に関する行動学的・生理学的表現型に影響がみられることが明らかになった。

まとめ・考察

本研究では、単一アミノ酸リピートの進化学的意義を検証するために、転写因子 POU3F2 の哺乳類特異的な単一アミノ酸リピートに着目し、その表現型レベルでの役割と機能的役割の検証を行った。その結果、①リピートは POU3F2 の活性を制御する、②リピートは神経幹・前駆細胞の分化に影響を及ぼし、アストロサイト産生に寄与する、③リピートは生体において認識・記憶機能に寄与することが明らかとなった。

アストロサイトは成体海馬におけるニューロン新生の分化・成熟に必要であることが報告されている。ゆえに、リピート欠失型マウスでみられた認識・記憶機能の欠損と成体海馬での新生ニューロンの分化阻害は、アストロサイトの減少に由来する可能性がある。

POU3F2 はニューロンへの分化を促進し、アストロサイトへの分化を阻害する働きをすることが報告されている。今回の結果より、単一アミノ酸リピートは POU3F2 の転写活性化能を低下させることが示された。すなわち、POU3F2 の活性の変化によって、リピート欠失型マウスでアストロサイト分化の抑制が生じた可能性が考えられる。脊椎動物の進化の過程で、アストロサイトは哺乳類で著しく増加した細胞である。ゆえに、進化の過程で獲得された POU3F2 の哺乳類特異的な単一アミノ酸リピートは、POU3F2 の活性に影響を及ぼすことで神経幹・前駆細胞の分化を変化させ、哺乳類のアストロサイトの増加に寄与した可能性がある(図 2)。

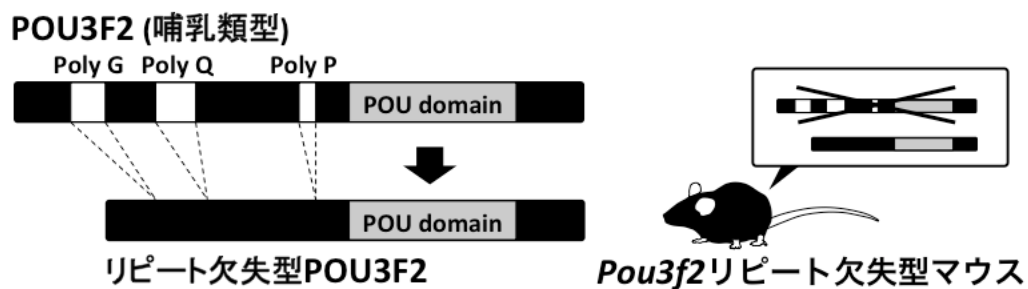


図1. POU3F2 と *Pou3f2* リピート欠失型マウス

哺乳類の *Pou3f2* 遺伝子には3つの単一アミノ酸リピート(それぞれ G、Q、P からなる)が存在する。これらリピートの役割を探るため、リピート欠失型 *Pou3f2* を作製し、マウスにノックインした。この遺伝子組換えマウスを用いて、脳の機能と発生における単一アミノ酸リピートの役割を調べた。

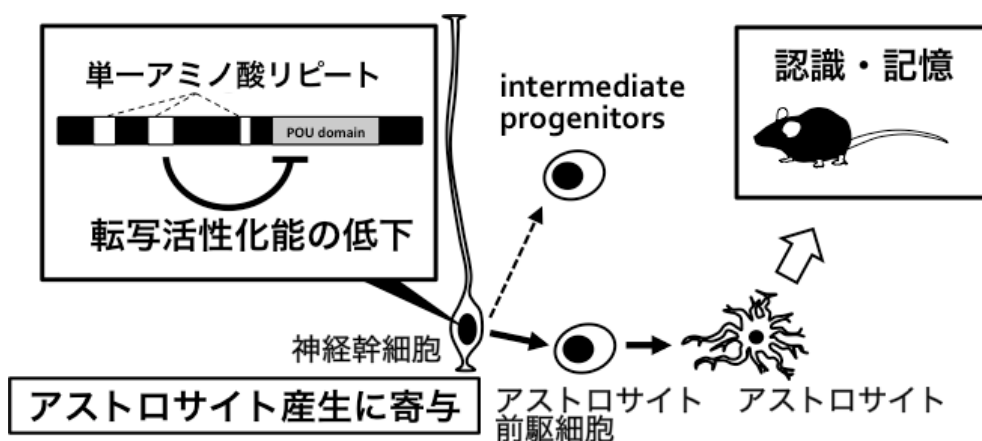


図2. 本研究の結果の概略

POU3F2 に挿入された哺乳類特異的な単一アミノ酸リピートは POU3F2 の転写活性化能を低下させる。神経幹・前駆細胞では POU3F2 によってアストロサイトへの分化は抑制されるので、リピートによる活性変化は、哺乳類能におけるアストロサイト増加に寄与する。アストロサイトは海馬でのニューロン新生などのプロセスを介して認識・記憶機能に関与する。