

## 論文の内容の要旨

論文題目 **Evolutionary analysis of brain function using non-mammalized  
(amphibian *Brn-2/Pou3f2* knock-in) mice**

(哺乳動物 *Brn-2/Pou3f2* の分子進化と脳の機能に関する研究  
- 両生類型 *Brn-2* ノックインマウスから脳の進化を探る -)

氏名 矢田 紗織

ヒトをヒトたらしめる特徴には、複雑な感情や行動、言語等があり、これらは高度に発達した脳により生み出される。脳の基本構造は全ての脊椎動物を通して共通しているが、鳥類では運動や平衡感覚に重要な小脳が発達しており、哺乳類では高次機能を司る大脳領域の発達が顕著である等、種特異的な特徴も多い。このような種間の差異、すなわち種特異的な形態学的特徴やそれに伴う行動基盤は、ゲノム中での種特異的な配列や遺伝子調節によって獲得されてきたと考えられている。

種特異的配列の一つに、単一アミノ酸反復配列(HPAAs)がある。HPAAs は多くの真核生物に存在するが、種間で長さが異なることがある。また哺乳類において特に多く存在しており、生体内で様々な機能を持つ構造であることが分かっている。中でも進化的に選択されてきた HPAAs 含有タンパク質には神経系の発生に関与するものが多いという報告があり、脳の進化と HPAAs の関連が期待される。

本研究では HPAAs を持つ遺伝子 *Brn-2/Pou3f2* に着目した。*Brn-2* は主に中枢神経系で発現する転写因子で、脊椎動物間で非常に保存性が高い。しかし哺乳類では 3 種類の HPAAs(polyG、polyQ、polyP)を含む一方で、両生類・魚類ではこれら 3 種の配列が完全に欠失している (図 1)。以上より、*Brn-2* は脊椎動物の進化の過程で polyG、Q、P 配列を獲得し、その結果、哺乳類の複雑な脳機能および構造形成に寄与した可能性が推測される。

そこで、本研究では“*Brn-2* の分子進化によって哺乳類の脳機能はどのように進化したか”について解明することを目的とし、マウス *Brn-2 (mBrn-2)* ORF をニシツメガエル

(*Xenopus tropicalis*) の *Brn-2* ホモログ(*xBrn-2*) ORF に置き換え、*xBrn-2* ノックインマウスを作成、解析を行った。

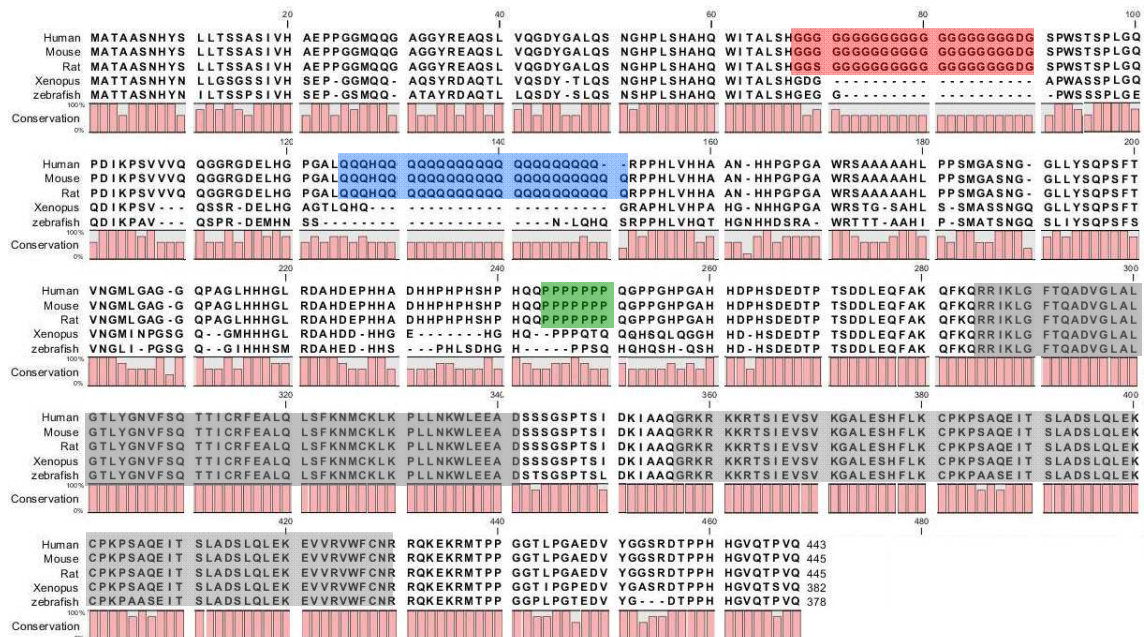


図 1. *Brn-2* Alignment (上からヒト、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ、シロイソナメ)。哺乳類以外の polyQ (青)、

polyP (緑) が存在。POUドメイン配列 (灰色) は完全に保存されている。

## 結果

### 1) *xBrn-2* ノックインマウスの作出

*xBrn-2* ノックインマウス作出にあたり、まず *Xenopus tropicalis* の肝臓からゲノム DNA を抽出し、*xBrn-2* を含む目的領域を得た。これをマウスゲノムと共にプラスミドに結合し、ターゲティングベクター (TV) を構築した (図 2)。

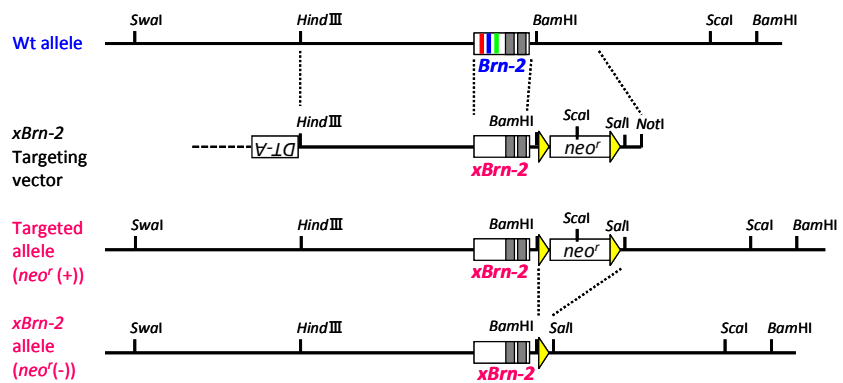


図 2. *xBrn-2* ノックインストラテジー

電気穿孔法によりマウス ES 細胞に TV を導入し、*xBrn-2* に相同組換えされた ES 細胞を選択した。これをマウス胚盤胞へ挿入し、代理母に出産させ、キメラマウスを作成した。キメラマウスは野生型 (Wt) マウスと交配を重ね、遺伝的背景が安定したノックインマウスを完成させた。以下の実験には全て遺伝子型ホモの個体(Homo)を用いた。

## 2)表現型解析

### ①メスの仔育て行動異常

Homo の外見は正常で、体重も Wt と有意な差は見られなかった。しかし母マウスが Homo の場合、仔の離乳率が非常に低いことを見出した。すなわち、母マウスが Wt の場合、仔の平均離乳率は約 75%であるのに対し、Homo の場

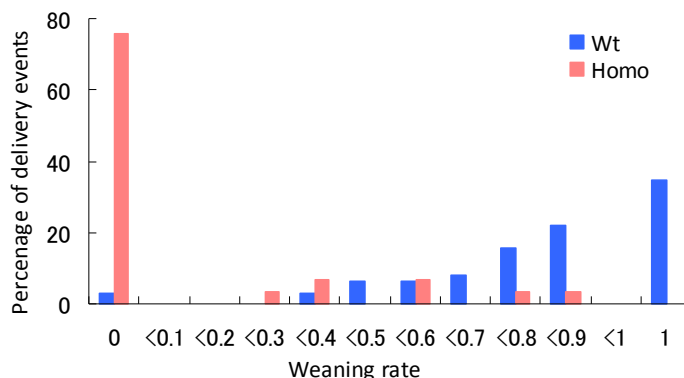


図 3. 出産後の仔の離乳率分布

合は約 20%であった。また Homo の出産の約 75%において、全ての仔が死亡していた(図 3)。生存(離乳)・死亡に関わらず仔の遺伝子型比はメンデル比に準じていたため、仔ではなく母マウスの仔育て行動に変異があると推測した。

出産後の野生型母マウスは、胎盤食、巣の再構築、仔回収(Retrieving)、保温、授乳等、一連の流れから成る仔育て行動(Maternal behavior)を行う。多くの哺乳類は出生後すぐには自力で移動・保温できず母親に依存せざるを得ないため、母親による仔回収は哺乳類の仔育てにおいて特に重要である。

そこで Wt および Homo のメスに対して Retrieving test を実施した。これはケージ内にいる 3 匹の仔マウスを成体メスが巣に回収するかどうかを調べる行動テストで、メスの仔育て行動を評価する方法の一つである。結果、Wt に比べて Homo は仔回収数が有意に少なく(図 4)、仔回収までにかかる時間も顕著に長かった。つまり、Homo は仔育て能力が著しく低下していることが明らかになった。

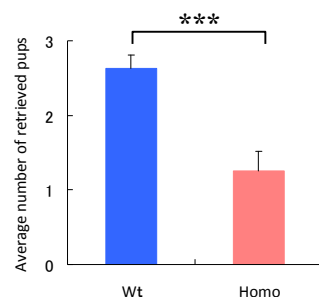


図 4. Retrieving test における仔の平均回収数

これより、脊椎動物の進化の過程で生じた *Brn-2* の配列変化が脳に影響を及ぼし、哺乳類の複雑な仔育て行動に寄与したと考えられる。

### ②嗅覚識別能力の低下

マウスは我が仔を嗅覚で主に認識する。これらの感覚系を調べるため、Habituation-dishabituation (H-DH)テストを実施した。

H-DH テストは嗅覚刺激に対する識別能力を評価する方法である。成体メスに仔マウス A または B を提示し、その間に仔の匂いを嗅いだ時間(Sniffing time ; St)を記録した。Wt では、仔 A を連続 4 回提示すると馴化により徐々に St は減少したが、その後仔 B を提示すると別個体であることを認識して St が上昇した。しかし Homo では Wt に比べ St が短く、また仔 A と B を別個体として全く認識していなかった(図 5)。つまり、Homo は仔への興味・関心が低く、かつ嗅

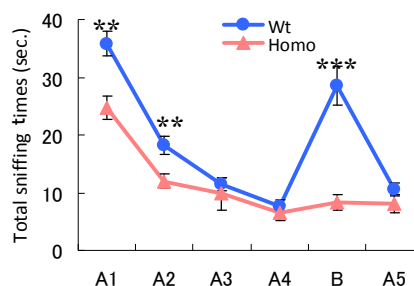


図 5. H-DH テスト結果

覚による個体識別能力が著しく低下していると考えられる。

### ③ドーパミン・セロトニン変異

ドーパミン(DA)とセロトニン(5-HT)は、脳内の広範囲に軸索を投射し動物の行動をコントロールしているモノアミン系の神経伝達物質で、特に仔育て行動や情動(快・不快、恐怖等の原始的な感情)に深く関与していることが知られている。情動に関する行動テスト(OFT)を行ったところ、Homoは不安・恐怖傾向が高いという結果が得られた。以上の結果はDAや5-HT変異の先行研究と非常に類似していることから、

*xBrn-2* ノックインマウスの行動変異にはDA及び5-HTの関連が予測された。そこで、DA、5-HT生合成酵素であるTH、TPH2について、それぞれ脳切片を免疫組織化学で染色した。THとTPH2は各生合成経路における律速酵素であり、DAと5-HTの発現量のマーカーとされている。染色後はMap Analyzerを用いて蛍光強度を測定し、発現量を定量的に解析した。結果、HomoはWtに比べてTH、TPH2発現量が減少していることが明らかになった(図6)。

### 結論および考察

本研究では*xBrn-2* ノックインマウスを作出した。このマウスは仔育て行動及び嗅覚識別能力が低下していることが明らかになった。更に、DA、5-HT合成の律速酵素であるTH、TPH2の発現量が減少していた。

DA、5-HTの欠乏モデルマウスにて、Retrievingを含む仔育て行動の異常が報告されており、これは今回の結果と一致する。またDAは学習・記憶や注意、5-HTは不安や攻撃性の制御にも深く関与しており、特に5-HT欠乏は恐怖・不安傾向が高くなるという報告がある。*Brn-2* 先祖返りマウスで見られた嗅覚記憶の低下や不安・恐怖増大も、DAや5-HTの影響が大きいと考えられる。

本研究では両生類*Brn-2*に組換えたことにより、*Brn-2*の哺乳類特異的配列に結合する*Brn-2*上流遺伝子や、TH、TPH2を含む*Brn-2*下流遺伝子による緻密な調節機構が変化していると推測できる。その結果哺乳類脳内神経伝達のバランスが崩れ、DA及び5-HT発現量が低下し、それに伴い仔育て行動の顕著な低下や不安・恐怖傾向の増大が観察されたと考えられる。すなわち、*Brn-2*内の哺乳類特異的配列が哺乳類の脳の機能調節において非常に重要であることが分かった。以上、本研究にて、*Brn-2*の分子進化が哺乳類の仔の生存に必須である仔育て行動や、原始的な感情である情動の制御に大きく関与していることが示された。

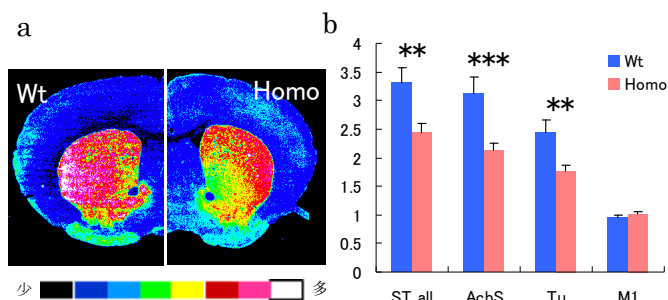


図6. THによる免疫組織化学染色結果

a Map Analyzerによる脳切片測光図。発現量は相対的に色分けされている。

b 各脳領域の定量的データ。HomoはTH発現が有意に低い。線条体(ST all)、側坐核シェル(AcbS)、嗅結節(Tu)はTH発現領域、一次運動野(M1)はコントロール領域。