

【学位論文】 論文の内容の要旨

論文題目：

Bone dynamics changes in modeling mice replaced by *Xenopus Brn-1/Pou3f3*

(神経系 POU 転写因子 *Brn-1/Pou3f3* のゼノパス型置換モデルマウスにおける骨動態変化)

氏名： 五十嵐 惇

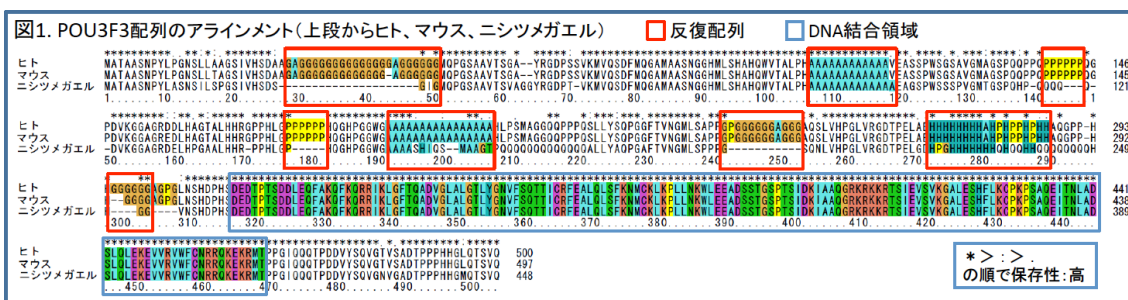
【序論】

多種多様な種の進化の過程でゲノム中に生じた特異的なパターンの獲得は、特徴的な行動・形態・生理的な変化をもたらしてきた。しかし、表出する系統的な特徴とゲノム中の構成要素に対する理解は未だ乖離している部分が多く残されている。

脊椎動物における哺乳類的な特徴は、体液中のホメオスタシス、高度に発達した脳、そして生存戦略と深く関わる胎生機構と授乳育児として見出す事ができる。様々な精神活動の中枢である脳は、他と一線を画す程に特殊化し、大脳新皮質の形成に重要な遺伝子である POU class III 遺伝子に着目した。POU class III 遺伝子中にはアミノ酸の反復配列 (HPAA repeats) がいくつも挿入されており、種特異的な挿入パターンを示す。HPAA repeats は近年転写因子中での機能的役割が注目され、特異的な認識や遺伝子中での伸長が付加的な調節に関して数多く報告がされている。

脳や腎臓の形成に必須な *Pou3f3 (Brn-1)* の哺乳類配列中には 8 カ所もの HPAA repeats の挿入が存在する一方で、他の脊椎動物はその多くを保持していない (図 1)。

先行的に進められた *Pou3f2* 遺伝子では独立した3カ所の HPA repeats が存在し、HPAA repeats 特異的な欠失体の解析は、神経伝達物質の発現低下を原因とした「母性行動の異常」と「仔の離乳率の低下」が明らかとなった。メインドメインとは別に新規に加えられた調節領域は遺伝子の co-option 化を促し、従来の機能を保ちつつ新たな役割・機能の獲得へと繋がる。機能ドメインとしての作用がいくつも報告される HPA repeats を含む哺乳類型 *Pou3f3* 配列は、有用な形質を系統特異的に加え、co-option 化を促す要素として保持されてきた可能性が考えられる。



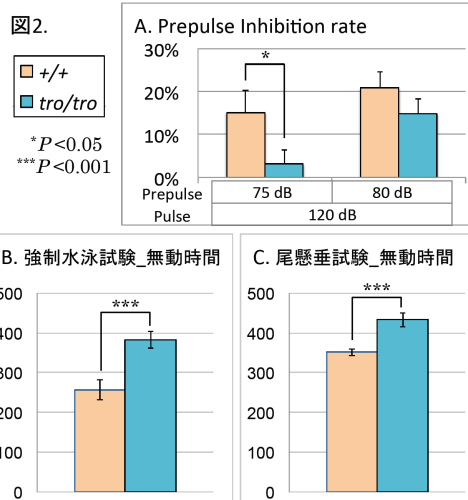
【実験手法・目的】

そこで、*Pou3f3* 遺伝子中に挿入された哺乳類特異的な領域の機能的意義を調べる為、マウスの *Pou3f3* を非哺乳類型の *Pou3f3* で置き換え、基本的な機能は残したまま哺乳類特異的 *Pou3f3* のもつ機能を探索した。非哺乳類型 *Pou3f3* として、HPAA repeats の多くが挿入されていない一方で、POU ドメインが 100%保存されている *Xenopus tropicalis Pou3f3 (xPou3f3)* をターゲティングベクターに組み込み、相同組み替えによって *xPou3f3* ノックインマウスを作出した。*in vivo* 解析には7回以上のバッククロスを行った雄個体を用いて行動学的・生化学的解析、及び遺伝子発現解析を実施した。

【結果】

xPou3f3 ホモノックインマウス (*tro/tro*) において、脳の外観・身体的特徴に大きな差異はなく、*xPou3f2* とは異なり育児・出生率等においても明らかな異常は観測されなかった。

統合失調症のスクリーニング試験である Prepulse Inhibition test は脳の不随意的な情報抑制機構である Sensorimotor Gating の指標となる。結果、*tro/tro* はプレパルスによる驚愕反応への抑制が低く、特に 75dB のプレパルスでの抑制率は有意に低下し、Sensorimotor gating 機構



による情報選択に異常を示し、一部、統合失調症様の表現型が判明した (図 2 A)。また、一方で鬱様行動のスクリーニング試験である尾懸垂試験・強制水泳試験は *tro/tro* にて野生型よりも有意に長い無動時間を示した (図 2 B-C)。これは学習的な絶望性無力傾向を強く示しており、諦めの早さと抑鬱傾向の高さを強く反映している。

抑鬱傾向の高さは高ストレステストにおける行動学的反応の異常とみなす事ができる。生命の脅威となるストレス刺激は視床下部-脳下垂体-副腎皮質系(HPA-axis)を軸とした体内の適切なストレス応答と行動変化を素早く引き起こし、生命維持や種の生存に重大なアドバンテージをもたらす。

本研究では拘束ストレスを含む一連の慢性ストレスの負荷による発現変化を、RNA-seq を利用したトランスクリプトーム発現解析にて定量した。Gene Ontology 解析は *tro/tro* における記憶学習・酸化ストレスに関連した遺伝子の発現がストレス負荷により *+/+* と大きく異なる結果を示した (図 3)。

ストレス下における慢性ストレス負荷は脳下垂体から放出される副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の前駆ポリペプチド *POMC* 発現を野生型 (*+/+*) にて 4.5 倍に上昇させる。しかし *tro/tro* では 2.8 倍程度と、その発現の上昇に差が見られた (図 4 A)。また *+/+* にてグルタミン酸受容体・GABA 受容体の発現低下を引き起こす一方、*tro/tro* はこの低下が広く減弱し、刺激に対して神経伝達物質が適切に調節されていないと考えられる (図 4 BC)。ストレスに伴う活性酸素種 (ROS) の誘発は各組織において SOD や GPx 等の抗酸化酵素の発現を促すことで速やかに代謝が行われる。実際に GO 解析によって示された 111 個の抗酸化遺伝子のうち、*Sod* や *Gpx*, *Prdx* を含む 22 種類の抗酸化酵素の発現が *+/+* にて上昇していたが、*tro/tro* では著しくこの上昇が減弱していた (図 4 D)。これを裏付けるかのように尿中の 8-OHdG 濃度はストレス負荷した *tro/tro* にて上昇傾向を示し、血中の ROS 増加に対して迅速な酸化ストレス応答が発揮されず、脳の組織障害性の増加と潜在的ダメージの蓄積が推定される。

一方で *Pou3f3* の発現がみられる視床下部は体内の恒常性をモニターする中枢である

図3. Gene Ontology解析 (*+/+* stress vs. *tro/tro* stress)

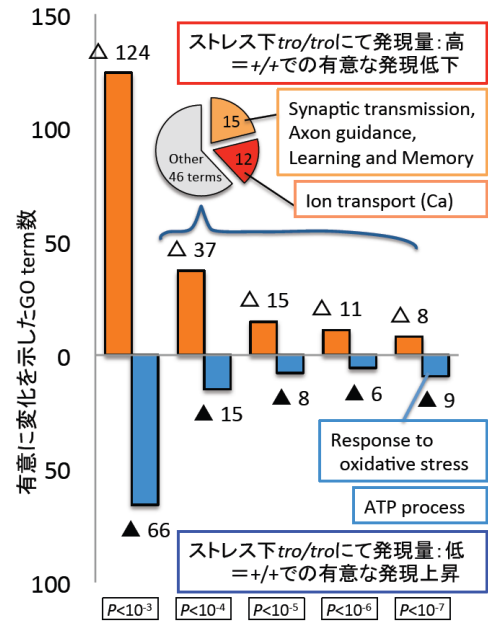
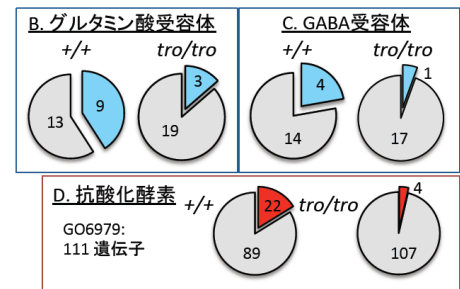
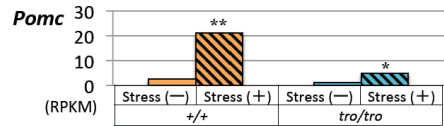
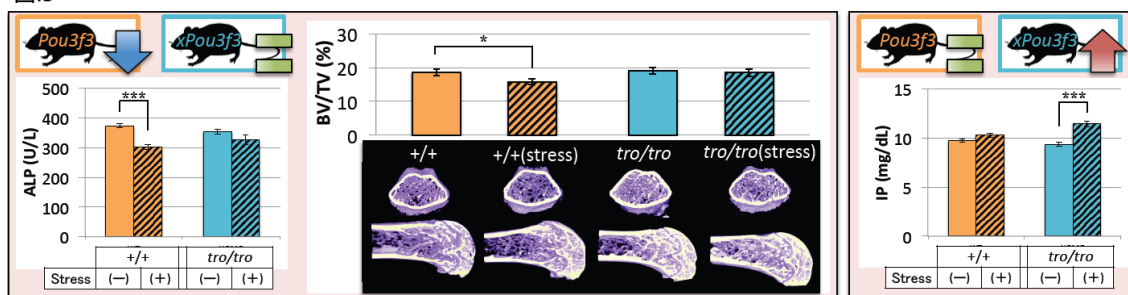


図4. A. POMC



ことから、環境変化に対する末梢における挙動も非常に興味深い。生理学的な解析では血中物質の測定から、ストレス下で+/+はアルカリフォスファターゼ（ALP）値の有意な低下を *tro/tro* では示さず、ストレスに対して non-sensitive であった。骨型 ALP は骨形成マーカーとして広く用いられることから、 μ CT 装置を利用して大腿骨における骨密度（BV/TV）の測定を行った。結果、+/+において ALP と同様に骨量の低下が確認された一方で、*tro/tro* では変化しておらず明確なストレス応答への感受性に相違がみられた（図5）。一方、血中の無機リン（IP）は *tro/tro* にて異常な上昇を示し、体液の恒常性において複数の項目で影響が示唆される結果となった。

図.5



【考察】

哺乳類の分子進化の過程において遺伝子重複とパラログの多様化は、種特徴的な形質の獲得に貢献し、様々な環境適応上において非常に有用なツールとなったと考えられる。本研究では *Pou3f3* を Non-mammalization（非哺乳類化）したマウスのトランスクリプトーム解析を通して、様々な環境的・精神的ストレスに対する反応を分子的に解明し、極限状態に直面した際の状況特異的な適応を量的な相違として示す事ができた。哺乳類型 *Pou3f3* の保持は慢性ストレス下の NMDA、AMPA 受容体および GABA 受容体の発現低下によって脳の高次活動を一時的に低下させ、慢性的な嫌悪記憶を弱める。また ROS に対する抗酸化酵素の発現上昇や、骨代謝変化を伴った全身性の恒常性の維持が強く励起される。しかし、本研究で作出された *tro/tro* は慢性的なストレスに対する反応が著しく減弱化し、脳の保護的作用が重大に損なわれていることが明らかとなった。同様に行動的に示された尾懸垂試験・強制水泳試験における学習性の無動状態もまたストレスに対する脆弱性が強く引き金となった可能性が挙げられる。

機能的重複のある遺伝子 *Pou3f2* と *Pou3f3* において両タイプの反復配列の挿入は、その挿入箇所が異なるだけでなく、その機能的な調節作用にも異なる影響を及ぼすことが明らかとなった。これは種特有な co-option 化の進行が機能的分化を促し、*Pou3f3* を‘自己防御機構’や‘恒常性’といった側面でも有利性の創出を示唆する。近年、多数の転写因子における HPA repeats の挿入に関する報告がされており、広範な遺伝子中で特徴的な発現・調節・相互作用をもたらし、種分化に貢献してきたのかもしれない。