

## 論文要旨

## 論文題目

Human dopamine transporter 遺伝子発現と新規調節候補遺伝子 Hesr1 に関する研究

Gene expression of human dopamine transporter and its candidate regulator Hesr1

福家 聡

精神神経疾患、生活習慣病や成人病などは、多くの遺伝子による複合的な現象や、環境等の相互作用によって発症する「多因子性疾患」であると考えられる。近年、SNP (Single Nucleotide Polymorphism) をはじめとする遺伝子多型と多因子性疾患との関連が広く研究されている。多因子性疾患や個人による気質の違いを同種における個体差とみなし、その原因を環境以外に求めるならば、遺伝子多型の存在は無視することはできない。多型の分子機能や個体への影響を明らかにすることで、多因子性表現型のメカニズムを遺伝子の発現量やタンパク質の活性変化など分子レベルの現象によって説明できるのではないかと考えられる。これらの遺伝子多型の中でも、様々な多因子性疾患や気質に関わっているとされるヒトドーパミントランスポーター (DAT1) 遺伝子の VNTR (variable number of tandem repeat) 多型に注目し、分子レベルでの機能を調べることで生理的意義の解明を目指した。

中枢神経系において神経伝達を司る物質の代表であるモノアミンのひとつであるドーパミンは、運動機能、認知機能、情動、行動強化における報酬効果、摂食行動、内分泌系の調節などに重要な役割を果たしているとともに、統合失調症 (Schizophrenia)、アルコール依存症 (alcoholism)、薬物依存症 (drug dependence) など多くの多因子性疾患に関係していると考えられている。また、Cloninger によれば、人格傾向の中でも遺伝性が強い気質「新奇性探求」は、ドーパミンとの関わりが

深いことが提唱されている。DAT は前シナプス膜上に存在し、シナプス間隙のドーパミンを細胞内へと迅速に再吸収することで、細胞間情報伝達を終える。DAT はコカイン(cocaine)等の精神作用を持つ薬剤のターゲットであり、これらの薬剤は DAT の機能を阻害することで、シナプス間隙のドーパミンを高濃度状態に保ち、その薬理効果を現す。また、パーキンソン病(PD: Parkinson's disease)患者において DAT のタンパク量が低下していることや、注意欠陥・多動性障害(ADHD: attention-deficit hyperactivity disorder)やトゥレット症候群(Tourette's syndrome)、大鬱病(major depression)においては過剰に存在することが知られている。加えて、DAT ノックアウトマウスでは、シナプス間隙のドーパミン除去遅延による自発的多動や体重減少による死亡の他にも、チロシン水酸化酵素やドーパミン受容体の mRNA 量の変化が観察されることから、*DAT* 遺伝子発現そのものが、生体内のドーパミン神経伝達に重要であると言える。

*DAT1* 遺伝子の 3'非翻訳領域に約 40 塩基を一単位とした領域が存在し、その反復回数の違いによって多型を形成している。この *DAT1* 遺伝子 VNTR 多型と、ADHD、パーキンソン病、双極性障害(bipolar disorder)、統合失調症、トゥレット症候群、薬物依存症、アルコール依存症、PTSD (posttraumatic stress disorder)等、ドーパミン神経系と関係する幾つかの多因子性疾患との相関だけでなく、人格傾向においても相関が調べられている。また、近年、*DAT1* 遺伝子 VNTR 多型の分子機能解析も行われ、*in vivo* および *in vitro* において VNTR 多型が遺伝子発現に影響を持ち、alleleによって差があることがわかりつつある。しかしながら、alleleによる差の傾向に統一された見解が得られていない。

そこでまず、哺乳類培養細胞株において、*DAT1* 遺伝子 VNTR 多型の遺伝子発現に対する影響をレポーターアッセイによって検討したところ、allele によって遺伝子発現量に差があることがわかった。しかしながら、細胞種によって差の傾向が異なることから、VNTR 多型の分子機能に影響を与える他の因子(群)の存在が示唆された。これは先行研究や本研究においても確認されたように、ADHD のリスク allele である 10-repeat が、最も大きい遺伝子頻度を示すことから、*DAT1* 遺伝子の VNTR 多型は、生理的な分子機能を持っていると考えられるが、精神神経疾患やヒトの行動・気質において、他の因子の影響を受ける「控えめな因子」であると考えられる。

*DAT1* 遺伝子 VNTR 多型は 3'非翻訳領域に存在するが、exon15 に含まれ、mRNA に転写されるため、長らく翻訳段階や mRNA の安定性に機能していると考えられていた。しかしながら、Michelhaughらによって、*DAT1* 遺伝子 VNTR 多型を含む領域が、転写段階で機能し、ドーパミン神経細胞における遺伝子発現を活性化していることが示された。加えて、本研究において観察された 3'非翻訳領域依存的な遺伝子発現抑制が全ての allele で観察されることから、VNTR 多型領域は、

allele に依存しない分子機能を転写調節の段階で担っていると考えられる。

そこで、yeast one-hybrid system 用いて、VNTR 多型 (10-repeat) を含む近傍領域に作用し、転写調節に関わる *trans*-因子の同定を試みた。*HIS3* および *LacZ* レポーター遺伝子による選択の結果、両遺伝子で陽性を示した 17 クローン中の独立した 2 つのクローンが、basic helix-loop-helix (bHLH) 型の転写因子である *Hesr1* (the Hairy/enhancer of split related transcriptional factor 1 with YRPW motif、別名 Hey1 / HERP2 / HRT1 / CHF2) 遺伝子の予測機能ドメインをすべてコードしていた。また、この活性が DNA 結合ドメインである bHLH 依存的事であること、ターゲット配列特異的事であることから、*DAT1* 遺伝子 VNTR 多型領域に働く *trans*-因子候補として、*Hesr1* についての解析を行うこととした。

哺乳類培養細胞におけるルシフェラーゼレポーターアッセイにより、*Hesr1* は DNA との結合に必須である bHLH ドメインと、リプレッサー活性を持つ Orange ドメイン依存的に *DAT1* 遺伝子発現を抑制することが示唆された。加えて、SH-SY5Y 細胞における内在性 *Hesr1* の特異的 siRNA によるノックダウンの結果や、HEK293 細胞における *Hesr1* の発現による内在性 *DAT1* 遺伝子発現抑制等の結果から、生体内もしくは細胞内において *Hesr1* が、*DAT1* 遺伝子発現に影響を与えることが示唆された。更に、内在性の 3' 非翻訳領域依存性遺伝子発現抑制を示さない HEK293 細胞において、*Hesr1* による *DAT1* 遺伝子発現抑制は、VNTR 多型が示す遺伝子発現量の差に影響を与えることがわかった。これらのことから、*Hesr1* が VNTR 多型や *DAT1* 遺伝子そのものが関わっている多因子性表現型において、より重要な因子であると考えられる。

また、exon2 の 3' 末端に 12 塩基の挿入が見られ、bHLH ドメイン中のループ領域に 4 残基の挿入が起こるヒト *Hesr1* のスプライシングバリエーションを同定し、これを *Hesr1*-12nt と名付けた。この *Hesr1*-12nt は核に局在するが、培養細胞における *DAT1* 遺伝子発現抑制活性は *Hesr1* よりも弱く、yeast one-hybrid system によってターゲット領域への作用には bHLH ドメインだけでなく、Orange ドメインも重要であることがわかった。これらのことから、*Hesr1*-12nt は生体内においても独立した機能を持っていることが示唆された。更に、ヒト *Hesr1* 遺伝子の SNP 候補である C386A は、bHLH ドメインの第二ヘリックスの高度に保存されたロイシンをメチオニンに置換する。本研究において、この C386A 変異により、*Hesr1* および *Hesr1*-12nt が *DAT1* 遺伝子発現抑制活性を失うことが示された。このように、*Hesr1* と *Hesr1*-12nt の *DAT1* 遺伝子発現抑制における活性の違いや、C386A による *Hesr1* の活性変化から、*Hesr1* 遺伝子発現やスプライシング、活性に影響を与えるような機能的多型は、VNTR 多型や *DAT1* 遺伝子そのものが関連する精神神経疾患等において、より重要なリスクファクターである可能性が高い。今後、様々な精神神経疾患について、SNP 候補 C386A や他のヒト

*Hesr1* 遺伝子多型の存在について調べることが必要であろう。

本研究において、私は *DAT1* 遺伝子の VNTR 多型が持つ分子機能をはじめとして、*DAT1* 遺伝子発現と新規調節候補遺伝子 *Hesr1* の関係を調べた。そして、多因子性表現型における新たなリスクファクターと成り得るヒト *Hesr1* 遺伝子 C386A 変異の機能を明らかにした。多因子性表現型の研究には、素因候補遺伝子のスクリーニングや、候補多型と疾患の統計学的相関解析といった従来の方法だけではなく、今後はこのようなアプローチが必要になると考えられる。