

この論文は、ヒトドーパミントランスポーター (DAT1) 遺伝子発現と、*DAT1* 遺伝子の VNTR (variable number of tandem repeat) 多型の関係をスタートとして、*DAT1* 遺伝子発現の新規調節因子の候補である *Hesr1* を同定し、その関係について詳細に解析した結果をまとめたものである。

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」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が、これら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分子レベルの現象によって説明できると考えられる。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 *DAT1* 遺伝子の VNTR (variable number of tandem repeat) 多型に注目した。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、大鬱病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ことが言える。

*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、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) 等の多因子性疾患との相関だけでなく、人格傾向の中でも遺伝性が強い気質「新奇性探求」との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、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、哺乳類培養細胞株を用いたレポーターアッセイによって、*DAT1* 遺伝子 VNTR 多型の遺伝子発現に対する影響は allele によって差があることがわかった。しかしながら、細胞内在的な 3'非翻訳領域依存的に示す遺伝子発現抑制の有無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。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、この 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、多因子性表現型において、他の因子の影響を受ける「控えめな因子」と考えられる。

また Michelhaugh らによって VNTR 多型を含む *DAT1* 遺伝子 3'非翻訳領域の一部が、ドーパミン神経細胞における遺伝子発現を転写段階で活性化していることが示されたことと、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結果、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) 遺伝子を候補として得た。また、この活性が DNA 結合ドメインである bHLH 依存的であること、ターゲット領域特異的であることから、*DAT1* 遺伝子 VNTR 多型領域に働く *trans*-因子候補として、*Hesr1* についての更なる解析を行った。

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解った。加えて、SH-SY5Y 細胞における内在性 *Hesr1* の RNAi によって遺伝子発現抑制が緩和されることや、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、HEK293 細胞においては、*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* 遺伝子そのものに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、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、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必要があるであろう。

以上のように、本研究は *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* の関係を明らかにしたものである。加えて、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、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ことを示した。従って、本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。