

2. 実験計画概要

*Brn-2*は、脳神経系で発現する転写調節因子をコードする遺伝子である。*Brn-2*のノックアウトマウスでは、視床下部の室傍核、視索上核の形成不全が観察された。*Brn-2*遺伝子によってコードされるBRN-2タンパク質のアミノ酸配列を脊椎動物内で比較すると、それらは大きく二つのグループに分類することができる。すなわち、単一アミノ酸反復配列を持つ高等脊椎動物（有羊膜類）型と単一アミノ酸反復配列を持たない下等脊椎動物（魚類・両生類）型である（図1）。哺乳類のBRN-2は、ポリグリシン、ポリグルタミン、ポリプロリンという三つの単一アミノ酸反復配列を持つ。このうちポリグルタミンは、PQBP-1 (poly-Q binding protein-1)タンパク質と相互作用することが知られている。PQBP-1は、ポリグルタミンとの相互作用を通じて、BRN-2の転写活性の抑制に働くことが報告されているが、*in vivo*での生理的機能は明らかではない。一方、魚類・両生類のBRN-2は、それら一つも持たない。魚類-両生類-哺乳類という進化の過程が成立することを考えると、これら三つの単一アミノ酸反復配列は、両生類からの分岐後、哺乳類に至る系統で獲得されたことを示唆する。ゲノムレベルの比較から哺乳類は、下等脊椎動物に比べて、単一アミノ酸反復配列をゲノム中に豊富に含むことが報告されている。このことは、単一アミノ酸反復配列の獲得はBRN-2特異的なものではなく、両生類からの分岐以降、頻りに起こったイベントであることを意味する。

ここで、私は、一つの仮説を提唱する。単一アミノ酸反復配列の獲得は、複数の遺伝子に共通したゲノムレベルの進化機構と考えることができ、これによって脳の進化を含めた生物の機能的進化が誘導されたと考えられることはできないだろうか。本研究では、この仮説を検証するため、マウスを用いて、*Brn-2*内の哺乳類特異的な三つの単一アミノ酸反復配列のコード領域（図1中赤字部分）をすべて欠く*Brn-2*Δ*GQP*（または*Brn-2*Δ）を作成し（図2）、解析を行った。*Brn-2*Δ*GQP*はいわば、下等脊椎動物型*Brn-2*と同等と考えることができ、このことから本実験は、*Brn-2*遺伝子の先祖返り実験と行うことができる。

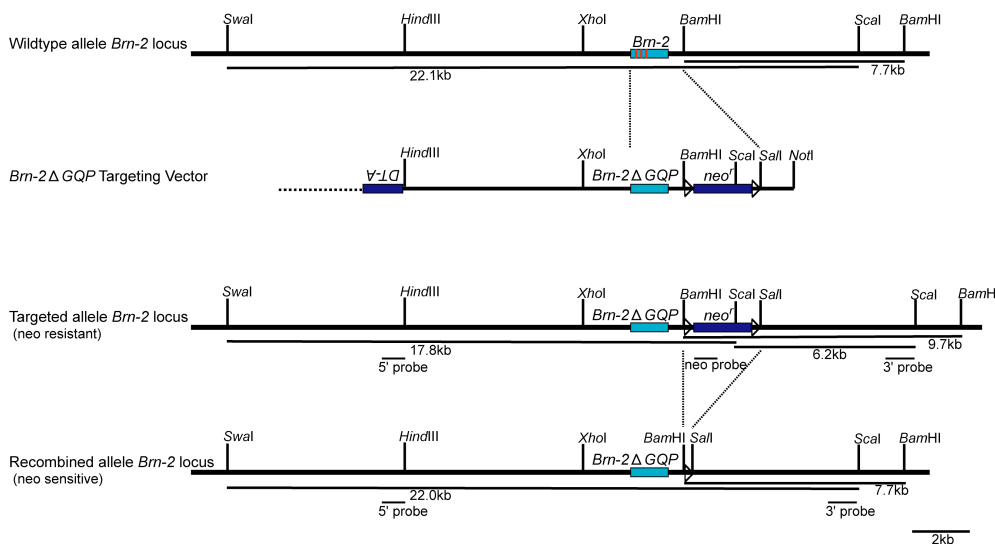


図2. *Brn-2*遺伝子座のターゲティングストラテジー。四段目に示すのが、*Brn-2*Δ*GQP*対立遺伝子である。

3. 結果

3-1. 基本的機能の保存

単一アミノ酸反復配列をヘテロ、またはホモで欠失したマウス（*Brn-2*Δ/+または*Brn-2*Δ/Δ）は、野生型マウス（*Brn-2*+/+）と変わらず、正常に発育し、妊性を持ち、寿命を迎えた。外見および脳の組織切片の観察から、BRN-2の単一アミノ酸反復配列の欠失は、胎仔期の発生および出生後の成長に影響を及ぼさないことが分かった。また、リアルタイムPCR法による定量的発現解析の結果から、*Brn-2*遺伝子（*Brn-2*+と*Brn-2*Δを区別しない）、およびその下流遺伝子*Oxytocin* (*OT*)、*AADC* (aromatic L-amino acid decarboxylase)の発現量は*Brn-2*の遺伝子型に依らないことが示された（図3）。以上のことから、BRN-2における単一アミノ酸反復配列が欠失しても、進化的に保存されたBRN-2の基本的な機能は影響を受けないということが出来る。

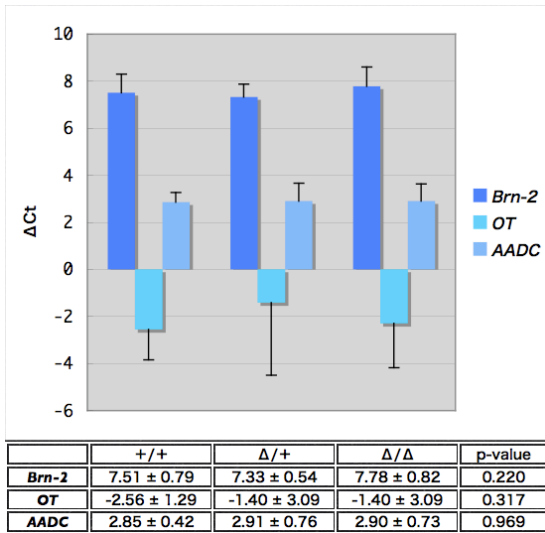


図3. リアルタイムPCR法による遺伝子の定量的発現解析。

Brn-2、*OT*、*AADC*の発現量を*gapd*の発現量で基準化した ΔCt 値で表す。

3-2. 仔育ての障害

一方、*Brn-2* ΔGQP 対立遺伝子を持つマウスは、仔育てにおいて、欠陥が観察された。すなわち、*Brn-2* ΔGQP 対立遺伝子の数に反比例して、仔の生存率の低下傾向が見られ、*Brn-2* $\Delta/+$ 、*Brn-2* Δ/Δ はともに*Brn-2* $+/+$ に比べて有意に低いことが分かった（図4中**で表した部分）。また仔の生存率低下は、仔の遺伝子型には依らず、母マウスの遺伝子型に依存していたことから、母マウスによる仔育て行動の違いに原因があると考えられる。そして、行動の違いは遺伝子発現の違いによって説明することができると期待される。

表1. マイクロアレイ解析における群分類

Group	Generation and genotype	Nurturing	Sample number
A	C57BL/6J	+	101, 102, 103
B	C57BL/6J	-	201, 202, 203
C	N7P2, <i>Brn-2</i> $\Delta GQP/\Delta GQP$	-	302, 303, 304

3.3 マイクロアレイを用いた候補遺伝子の網羅的探索

そこで、次にマイクロアレイ解析を行い、*Brn-2*の遺伝子型による違い、仔育ての有無の違いを反映する候補遺伝子を探索した。用いた個体は、出産日に仔育てをしている野生型C57BL/6J マウス（A群）、仔育てをしていないC57BL/6J マウス（B群）、仔育てをしていないホモ変異型マウス（C群）である（表1）。各群3個体ずつ用いて（図6中、列の項）、ANOVAにより、群間における発現の差が有為な遺伝子をスクリーニングし（図5）、47個の候補遺伝子を得た（図6中、行の項）。C群特異的な発現変動を示す遺伝子は、BRN-2の単一アミノ酸反復配列の欠失による作用を受けて、仔育ての成績の低下を引き起こした責任遺伝子の可能性が高い。これらの候補遺伝子のうち、95%の遺伝子は、UniGene、SymAtlas、GENSAT、FANTOMのデータベースから、実際に脳で発現していることが支持された。今後、これらの遺伝子を解析していくことで、BRN-2の単一アミノ酸反復配列の仔育て行動における機能をより詳細に明らかにすることができると期待される。

図5. マイクロアレイ解析を用いた候補遺伝子選別のための手順

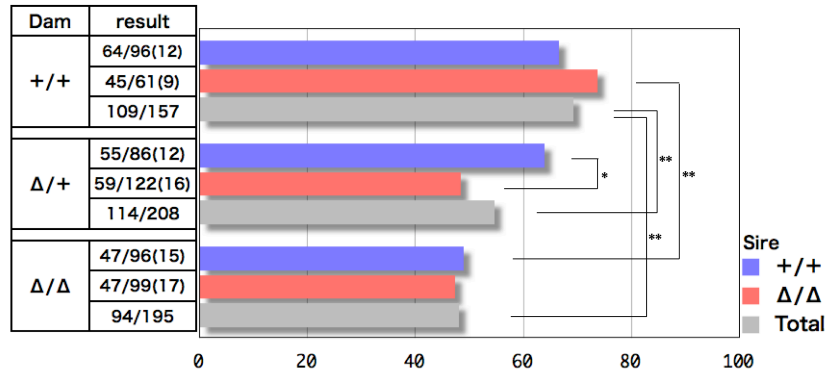


図4. 母の遺伝子型別にみる仔の生存率。夫の遺伝子型を区別しない三群比較（灰色の棒グラフ）でp値は'0.00028'であった（フィッシャーの正確検定による）。

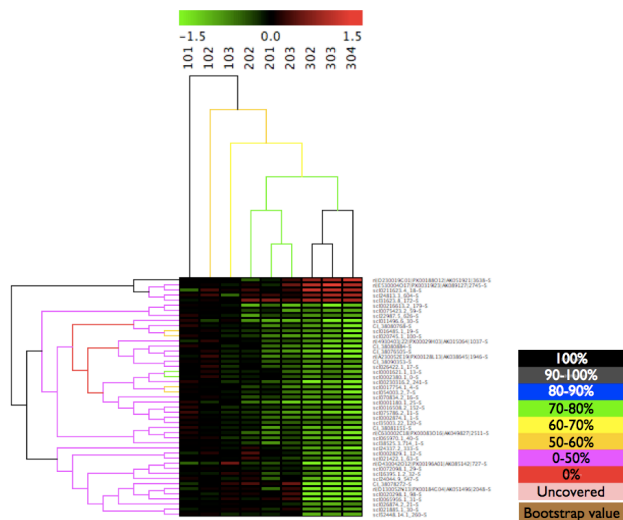


図6. 候補遺伝子を用いた階層型クラスター解析。
 (A群: 101-103, B群: 201-203, C群: 302-304)
 (列: アレイ系統樹, 行: 遺伝子系統樹)

3-4. 母性行動の時系列的発現

仔育て行動は母性行動と呼ばれるいくつかの行動群によって説明される(表2)。母性行動を詳細に観察した結果、少なくとも二つの行動の対照的な結果を見出した。すなわち、*Brn-2*の遺伝子型によらず、Placentophagia(胎盤食)はたいてい正常に行われる一方、Nursing(授乳)は、ほとんど行われることがなかった。これらを行動が見られた順で時系列的に並べてみると、母性行動の初期の行動は正常で、Nursingの発現までに異常を来していることが分かった。このことから、*Brn-2*の単一アミノ酸反復配列の作用点は母性行動が動機付けられてからNursingの発現までの間にあると考えられる。

表2, 母性行動の時系列的発現

Maternal behavior	Normal nurturing dams	Nurturing absent dams
Placentophagia (placenta)	+	+
Nest building	+	±
Pups retrieval	+	±
Crouching on pups	+	±
Nursing (milk)	+	-

4. 考察

4-1. BRN-2の単一アミノ酸反復配列は状況特異的な機能ドメインである

本研究において注目したBRN-2の単一アミノ酸反復配列は両生類までには存在せず、哺乳類に至る系統で初めて獲得されたものである。単一アミノ酸反復配列の欠失は、BRN-2において進化的に保存された基本的な機能には影響を与えず、仔育て行動という状況特異的な機能に限定して影響を与えた。このことは、BRN-2の哺乳類特異的な単一アミノ酸反復配列が、状況特異的に機能していることを示唆している。高等動物では、組織、時期、状況の違いに応じて適切に遺伝子発現を制御することが必要とされる。単一アミノ酸反復配列は、元のタンパク質の機能を乱すことなく、状況特異的に働く機能ドメインとして、遺伝子の発現制御に関わっていると考えられる。

4-2. 単一アミノ酸反復配列は進化の媒体となった

単一アミノ酸反復配列の獲得は、BRN-2に限らずゲノムレベルで広く見られることから、哺乳類の多くの遺伝子が単一アミノ酸反復配列の獲得によって機能的に進化を遂げた可能性が示唆される。このようにゲノムレベルに広げて考えると、単一アミノ酸反復配列の獲得は、ゲノムレベルで起こった機構と考えることができる。また、単一アミノ酸反復配列の獲得と喪失は頻繁に起こっているようである。単一アミノ酸反復配列は、獲得に際して過激な変化を起こさないようなDNA上の変異である一方で、哺乳類の(もしかしたら有羊膜類の)複数の遺伝子に機能的進化をもたらす得る進化のための媒体となったのかもしれない。*Brn-2*の先祖帰り実験は、上記仮説を支持する結果となった。仮説のさらなる検証のためには、単一アミノ酸反復配列を進化的に獲得した他の遺伝子についても調べてみるのが有効だろう。