

Analyses on physiologic roles of X11-like/Mint2 in vivo

(中枢神経系における X11-like/Mint2 の生理機能解析)

学位論文内容の要旨

X11-like/Mint2 (X11L)は、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) に結合するタンパク質として当研究室により単離・同定された。X11L は X11/Mint1、X11L2/Mint3 と遺伝子ファミリーを構成し、これらは C 末側に非常に高い相同性を持つ。APP の代謝異常により過剰産生される神経毒性を持つアミロイドβ (Aβ) は Alzheimer 病 (AD) 症状の主な起因因子と考えられる。培養細胞を用いた解析から、X11L が Aβ の過剰産生を抑制することが示唆されている。また、X11L はシナプス可塑性を制御する分子群とも結合する。さらに AD の特徴的な病理所見である老人斑において X11L の集積が観察されている。これらの成績は、X11L が *in vivo* において APP 代謝および神経可塑性を調節する可能性を示唆するが、これまでに、*in vivo* における機能は明らかにされていない。本研究は、「X11L の機能不全が APP 代謝調節および神経可塑性制御機構の破綻に繋がり、AD における認知障害、精神病様症状、ストレスに対する過感受性等の症状の一端を担う」との仮説を立て、これらを検証する手段として X11L 遺伝子欠損変異マウスを作製し、*in vivo* における X11L の生理機能を明らかにしようとするものである。

(X11L の脳内局在の解析) X11L と X11 は構造的にも、また *in vitro* の機能解析からも非常に良く似た性質を持つ。X11L と X11 は脳全域にわたり分布するが、細胞レベルでの局在は異なっていた。記憶学習の責任領域とされる海馬において、X11L は CA3 の錐体細胞に高レベルに局在が観察されたのに対し、X11 は主に抑制性神経細胞に局在が観察された。また、情動機構に関わる扁桃核 (基底) 外側核、海馬への情報の出入力経路にあたる海馬台、成体においても神経新生が起きている歯状回顆粒細胞の最内層において X11L は X11 よりも強い局在を示した。これらファミリー分子間の局在パターンの違いは *in vivo* において、これらが独立した生理機能を有していることを示唆する。

(X11L 遺伝子変異欠損マウスの作製) X11L 遺伝子欠損変異マウス (以後、変異マウスと呼ぶ) は、翻訳開始点を含む領域を相同組み換えで欠失させることにより作製した。変異マウスは外見上の異常を示さず、繁殖行動も正常であった。

(APP 代謝解析) 変異マウスにおける APP 代謝過程を解析するために、APP の各代謝産物量について野生型マウスと比較した。その結果、代謝を受ける前の全長 APP 量、代謝後の N 末端側の分泌型 APP 量、C 末端側の APP 量の全てにおいて、変異マウスと野生型マウス間に差異を検出しなかった。また、AD における特徴的な病理所見である神経変性に伴う神経細胞死、シナプス損失、および反応性神経膠症も変異マウスでは観察されなかった。

〈シナプス分子の解析〉シナプス分画を調整し、X11Lにより機能調節を受けていると考えられる各タンパク質を定量した。その結果、野生型マウスと変異マウスの間で量的差異を検出できた分子は無かった。

〈行動学的解析〉飼育環境下での基本的活動量と概日リズム、新規探索性、不安、うつ病様行動については、変異マウスと野生型マウスとの間に差異を検出しなかった。また、空間記憶、作業記憶、連合記憶においても変異マウスと野生型マウスとの間に差異を認めなかった。

〈ストレス感受性に関する解析〉同一ケージ内に変異マウスと野生型マウスを集団飼育した条件で、通常摂食時体重の4%の餌で体重制限を行ったところ、変異マウスで有意に大きな体重の減少を観察した。また、4匹当たり1個の固形飼料として給餌した場合の餌摂取量は、変異マウスで有意に低かった。一方、1匹飼育において、摂食量および体重増加率に野生型マウスとの間に差異は検出されなかった。これらの結果から、食餌制限ストレスにより変異マウスの食欲が低下しているのではなく、野生型マウスとの間の競争環境下で地位が低下している可能性が考えられた。社会的優位性と遺伝子型の関係の評価するために、野生型マウスと変異マウスを混ぜたケージ（混合遺伝子型飼育ケージ）、もしくは片方の遺伝子型だけのケージで食餌制限を行った。その結果、混合遺伝子型飼育においてのみ野生型マウスに比べて、変異マウスにおいて有意に大きな体重減少を示した。これらの結果は、変異マウスが社会的劣位になり、摂食競争に敗れ、身体的、精神的ストレスが恒常的に負荷された結果として体重が減少したことを示唆している。繰返される社会的敗北による精神的ストレスにより、うつ病様症状を示すことが知られている。事実、食餌制限による競争環境下で飼育した後、オープンフィールドで測定した活動量は変異マウスで有意に低下していた。この活動量の低下は競争環境を解除することにより回復した。これらの結果は、変異マウスが精神的ストレスに対して感受性が高く脆弱である事を示唆している。

次に身体的ストレスに対する応答に関して以下の解析を行った。異なる強さの電気ショックを与え、直後のすくみ反応を解析したところ、弱い刺激に対して変異マウスは野生型マウスよりも有意に高頻度のすくみ反応を示した。また、慢性ストレスに曝された変異マウスは、野生型マウスより有意に低いオープンフィールド活動性を示した。これらの結果は、変異マウスが身体的ストレスに対しても、より高い感受性を持つことを示唆している。変異マウスにおけるストレスに対する感受性の亢進は、不安反応を増大し、さらに競争環境下で社会的地位の低下となり、さらなるストレスを生んでいると考えられる。

ストレス反応は、視床下部-脳下垂体-副腎皮質からなるHPA axisにより制御されている。身体的、精神的ストレスによるHPA axisは辺縁系による調節を受けている。また、HPAシステムにより放出されたストレスホルモンは中枢（主に海馬）に情報をフィードバックし様々な生体反応を引き起こす。ストレスホルモンにより海馬では、CA3錐体細胞の先端樹状突起の萎縮、そして歯状回最内層における成体神経新生の低下が起きる。X11Lはこれらの領域で強い局在が観察され、X11と発現の重複性が低いことから、変異マウスでの異常は海馬の機能異常を反映している可能性が高い。

本研究によりX11Lの欠損はAPPの代謝調節、ADと関連した病理異常、そして記憶学習機構に大きな影響を与えない事が明らかとなった。しかし、これらの結果はX11Lがこれらの機構に

関与していないということではなく、構造的、機能的に非常に良く似た X11 の機能代償が十分に働いている可能性が高い。この点に関しては、X11L と X11 の二重変異マウスの解析が待たれる。また、X11L はストレスに対する適応機構において主要な役割を果たす事が明らかとなった。X11L 欠損マウスは、ストレスと精神疾患の関連、および機構を解明する上で有用なモデル動物になると考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 利 治
副 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 助 教 授 大 熊 康 修
副 査 助 教 授 松 岡 一 郎

学 位 論 文 題 名

Analyses on physiologic roles of X11-like/Mint2 in vivo

(中枢神経系における X11-like/Mint2 の生理機能解析)

本研究は、神経特異的アダプター分子 X11L の生体内機能を遺伝子欠失マウスの作成と解析により行った成果である。X11L は当研究室でアルツハイマー病の発症に強く関わるアミロイドβ-タンパク質(Aβ)の前駆体 APP に結合する因子として単離された。また、他の研究室よりシナプス機能に関わる因子としても報告されている。細胞を用いた *in vitro* の機能解析は報告されているが、*in vivo* における機能解析はなされていなかった。本研究は、X11L 遺伝子欠失マウスを作成し、その解析を行った点で X11L の *in vivo* における機能解析を行った初めての報告である。特に、世界的にも報告例の少ないコンジェニック系統として遺伝子欠失マウスの作成に成功した点は、遺伝的背景を均質にした質の高い詳細な行動解析を可能とした。この点は高く評価された。

生化学的・免疫組織化学的な詳細な解析から、X11L 遺伝子欠失マウスの脳で APP の代謝変動における顕著な影響は観察できなかった。X11L は細胞に過剰発現した際、APP の代謝を安定化する効果があるので、X11L 遺伝子欠失マウスでは APP 代謝が不安定化する可能性が指摘された。この点は、博士論文でも解析しているように、ファミリー分子 X11 が X11L と共に神経細胞に広く発現しているため、補償効果から生化学的な解析では検出が困難であるのが事実であろう。Aβ 量の変動に関しては、予備的な測定結果があるが、例数の問題などで博士論文には含めていない。ファミリー分子 X11 との二重変異マウスの解析を進めるべきであるとの審査も頂いた。すでに二重変位マウスは誕生しているが、成果は予備的であるため博

士論文には含めていない。

本研究で、明らかになった最も意味のある事実は、X11L 遺伝子欠失マウスがストレスに対する感受性が極めて高い点である。特に個体間に競争的条件がある時に、この感受性が高まる発見は、ストレス反応の分子機構を解明する上で重要な知見を与えたと評価された。このような特定の条件下における行動様式の差を表現型として確かに検出できたのはコンジェニック系統のマウスを作成した成果であるとともによく練られた緻密な行動解析研究の成果と評価された。現代社会で問題となっている精神的ストレスとその結果としての社会的地位の低下を科学的に解明するために有効な疾患モデルマウスになる可能性も論議された。ファミリー分子である X11 の遺伝子欠失マウスはコンジェニック系統ではないため、このような表現型は報告されていない。本研究から X11L と X11 が同じ機能を持ちつつも局所的に異なる機能を発現していることが *in vivo* で解明された点も評価できる。

本研究論文では、X11L が若齢マウスの海馬歯状回顆粒細胞の最内層で特に強い発現を示している点を報告した。神経新生との関連性で解析を進めると興味深いという審査結果も頂いた。本人はこの発見の解析にも取り組んでいたが、博士論文としては、まとまりを考えて行動解析を主体にしてまとめた。

博士論文は、しっかりと書かれており、本人が論理的思考によく訓練されており、博士としての識見を身につけていることを表している。また、口頭試問にも的確に応答した。また、本論文にまとめた以外にも、前述の神経新生の問題など興味深い予備的成果を得ており、今後の発展も期待できる。一連の研究を通して本人が問題を発掘し解析し解明する研究者としての素質を持っていることが明らかになった。

以上の審査結果から、論文が博士（薬学）号の授与に値し、また佐野良威が、博士として十分な学問的素養と能力を持っていると認める。