

## Activity-dependent regulation of BRINP family genes

(神経活動による新規神経特異的遺伝子 BRINP ファミリーの発現制御)

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】: 我々はこれまでに、交感神経細胞の分化過程において骨形成因子 (BMP: Bone morphogenetic protein) とレチノイン酸 (RA) によって発現が調節される新規タンパク質ファミリー、BRINP (BMP/RA-Inducible Neural specific Protein-1, 2, 3) を同定した<sup>1,2)</sup>。BRINP ファミリーは、種間で保存性が極めて高いが、既知のタンパク質と類似性を全く有さない新規のタンパク質ファミリーであり、中枢および末梢神経系の広範な領域において発達期から神経細胞特異的に発現している。また我々は強制発現させた各 BRINP が正常動物細胞に対して細胞周期抑制能を有することを明らかにした。この知見から、各 BRINP 遺伝子は増殖性の神経幹細胞から非増殖性の神経細胞へと分化する過程で、細胞周期の抑制を介した神経分化調節に関与していると考えられる。一方で、成熟期にも各 BRINP 遺伝子の神経細胞特異的な発現を認めるが、神経組織における生理的役割はほとんどわかっていない。今回我々は、神経活動が中枢神経における BRINP ファミリー遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。

【方法と結果】: 神経細胞興奮のモデルとして、8 週齢の C57/BL6 雌マウスにグルタミン酸受容体アゴニストであるカイニン酸 (20mg/kg) を腹腔内投与した。まず、カイニン酸刺激後の脳内における各 BRINP-mRNA の発現変化を、digoxigenin で標識した c-RNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法により評価した。成熟マウスに対するカイニン酸腹腔内投与後 6 時間で、脳海馬、中でも歯状回において BRINP1 の発現が特異的に上昇した (図 1 A-F)。海馬組織の定量的 RT-PCR では、BRINP1-mRNA の発現上昇が、カイニン酸刺激後 3 時間より開始し、6 時間をピークとして、12 時間後には定常レベルに戻っていた (図 1 G)。次に *in vitro* における各 BRINP-mRNA の神経活動による発現制御を調査するため、E17 胎生マウスの海馬初代培養を行った。培養 5 日目の初代培養神経細胞に対してカイニン酸刺激を行い、各 BRINP-mRNA レベルを定量的 RT-PCR 法により評価した。成体脳における変化と同様に刺激後 6 時間をピークとして BRINP1-mRNA の特異的な発現上昇を認めた (図 2 B)。この BRINP1-mRNA の発現上昇は 50 $\mu$ M をピークとして容量依存的な変化を示した (図 2 A)。一方、BRINP2, 3-mRNA は成体脳および海馬培養細胞においてカイニン酸刺激によってほとんど変化しなかった (図 1 G、図 2 AB)。このような BRINP1-mRNA の発現変化は、神経活動に伴う神経栄養因子 BDNF の発現増加のパターンと類似している (図 2 C)<sup>3)</sup>。しかし、海馬ニューロンを BDNF で刺激しても BRINP1 の発現は変化しなかったことから、BRINP1 の発現増加は培養液中に分泌された BDNF によって二次的に引き起こされるものではないことが確かめられた。

【考察】: グルタミン酸刺激による海馬神経細胞の過剰な興奮は、神経細胞死、神経可塑性、および神経再生に関与することが知られている。神経細胞の興奮により誘導される神経栄養因子や TGF- $\beta$ ファミリーなどがこれらの現象に関与することが報告されているが、詳細な分子レベルのメカニズムは明らかにされていない。

神経活動に伴って特異的に誘導される BRINP1 の役割として、いくつかの可能性が考えら

れる。一つは、BRINP1 が過剰に活性化された神経を細胞死から保護する可能性である。成熟した神経細胞は分裂を停止した状態にあるが、過剰に活性化された神経細胞では細胞周期関連遺伝子が増加することが報告されており、分裂はできないものの再び細胞周期に入ろうとし、最終的にアポトーシスに陥ることが知られている<sup>4)</sup>。また、通常の増殖性の細胞において強制発現させた BRINP が細胞周期を抑制することを我々は見いだしている<sup>1)</sup>。これらのことから、過剰に活性化され細胞周期に再び入ろうとする神経細胞において、誘導された BRINP1 が細胞周期を抑制し、結果的に神経細胞を細胞死から救う可能性が考えられる。また、BRINP1 のシナプス可塑性への関与も考えられる。発達期のマウスにおいては神経細胞が突起を伸長しシナプス形成を行う時期に BRINP1 の発現が高く、成体になるにつれてその発現は減少する<sup>1)</sup>。成体脳では定常レベルにある BRINP1 がカイニン酸刺激により一過的に上昇しその後定常レベルに戻る。このことから BRINP1 が発達期のシナプス形成、成体における神経活動に伴うシナプス可塑性に関わる可能性が示唆される。

**【結語】**：海馬神経細胞において神経特異的新規遺伝子群 BRINP ファミリーの内 BRINP1 遺伝子が特異的に神経活動依存的な発現調節を受けることが明らかとなり、本遺伝子が中枢神経細胞における生理的・病的活動に関与していることが示唆された。今後 BRINP1 遺伝子のノックアウトマウスを作成し、BRINP1 の脳海馬組織における具体的な生理機能を解明していく予定である。



図1 カイニン酸腹腔内投与におけるBRINPファミリーmRNAの発現変化 (A-F) in situ hybridizationによるBRINP1-mRNAの発現 (G)定量的RT-PCRによるBRINPファミリーmRNAの発現

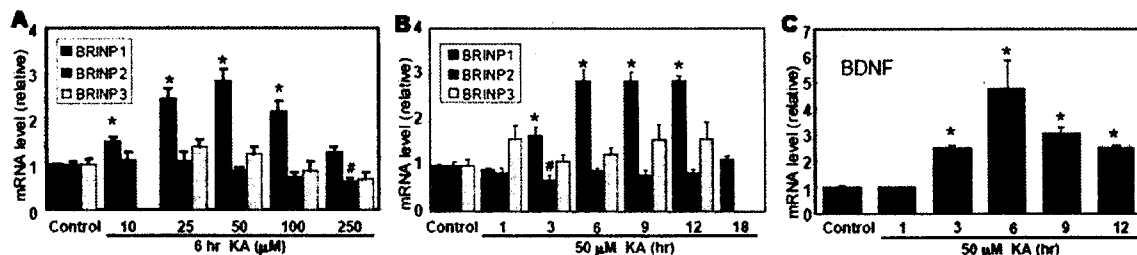


図2 海馬初代培養神経細胞におけるカイニン酸刺激によるBRINPファミリー(A,B)およびBDNF(C)mRNAの発現変化

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 和 則

副 査 教 授 藤 堂 省

副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

## Activity-dependent regulation of BRINP family genes

(神経活動による新規神経特異的遺伝子 BRINP ファミリーの発現制御)

これまでに、新規神経特異的遺伝子群 BRINP ファミリー、BRINP1, 2, 3 を同定してきた。各 BRINP 遺伝子は、中枢および末梢神経系の広範な領域において神経細胞特異的に発現しているが、神経組織における生理的役割はほとんどわかっていない。今回申請者は、神経活動が中枢神経における各 BRINP ファミリー遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。

グルタミン酸受容体アゴニストであるカイニン酸を成体マウスに腹腔内投与し、脳内における各 BRINP-mRNA の発現変化を *in situ* hybridization 法により評価した。その結果、カイニン酸投与後 6 時間で、海馬、中でも歯状回において BRINP1 の発現が特異的に上昇した。さらに胎生マウス海馬の初代培養神経細胞に対してカイニン酸刺激を行い、各 BRINP-mRNA レベルを定量的 RT-PCR 法により評価したところ、成体脳における変化と同様に刺激後 6 時間をピークとして BRINP1-mRNA の特異的な発現上昇を認めた。一方、BRINP2, 3-mRNA は成体脳および海馬培養細胞においてカイニン酸刺激によってほとんど変化しなかった。

グルタミン酸刺激による海馬神経細胞の過剰な興奮は、神経細胞死、神経可塑性、および神経再生に関与することが知られている。神経細胞の興奮により誘導される神経栄養因子や TGF- $\beta$  ファミリーなどがこれらの現象に関与することが報告されているが、詳細な分子レベルのメカニズムは明らかにされていない。本研究から海馬神経細胞において BRINP ファミリーのうち BRINP1 遺伝子が特異的に神経活動依存的な発現調節を受けることが明らかとなり、本遺伝子が中枢神経細胞において神経保護作用や神経可塑性などの生理的・病的活動に関与していることが示唆された。

審査にあたり、副査藤堂教授からグルタミン酸刺激が神経に及ぼす刺激はどのようなメカニズムなのか、カイニン酸刺激による BRINP1 遺伝子の発現誘導は *in situ* hybridization の結果を見ると海馬のみでなく脳切片全体に生じているのではないかと、脳虚血モデルでカイニン酸刺激と同様に海馬に神経変性が生じることが知られているのでより臨床に近いモデルとして脳虚血モデルで BRINP ファミリーの発現制御を検討したらどうか、との質問があった。申請者はグルタミン酸刺激がどのように脳組織へ作用しているのかははっきりしたことは分かっていないが、容量依存的に生理的刺激としても毒性刺激としても作用すること、カイニン酸による BRINP1 遺伝子の発現誘

導は脳組織全体に認められるが本研究では最も変化した部位を対象に研究を行ったことを回答した。次いで主査安田教授から、mRNA レベルでの実験系がおこなわれているが実際の BRINP タンパクの作用などは検討しないのか、カイニン酸刺激で誘導される遺伝子群と BRINP1 遺伝子の相互作用の検討はしないのか、BRINP ファミリーの神経系以外の細胞への作用は分かっているのか、ノックアウトマウスの表現型で何か欠落症状は見つかっていないのか、との質問があった。申請者は BRINP タンパクがまだ精製されていないだけでなく BRINP 抗体も存在しないため、現在研究が遺伝子レベルでしかおこなえていないこと、そのため BRINP1 遺伝子と誘導遺伝子の関係を検討することは困難なこと、また BRINP1 遺伝子が膀胱癌に関与する遺伝子としてすでに研究されていること、ノックアウトマウスの表現型に特に異常が見つかっていないことを回答した。また副査三浪教授から、最終的には脊髄損傷モデルにおける BRINP ファミリーの役割を解明できれば素晴らしいとのコメントがあり、また BRINP2, 3 に関して他にわかっている知見は何か、との質問があった。申請者は BRINP2 は細胞周期抑制作用以外に分かっている知見はないが、BRINP3 に関しては下垂体腫瘍で発現が亢進するという報告があることを回答した。

この論文は、神経活動依存的に誘導される BRINP1 が神経保護に寄与する可能性を示唆しており、さらなる研究により BRINP1 遺伝子が神経損傷のメカニズム解明や治療法の開発に重要な役割を担っていくと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。