

氏 名 田邊 彰

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1726 号

学位授与の日付 平成26年9月29日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Molecular Genetic Analysis of Mechanism for High Behavioral
Stress Responses in Wild-derived Mice

論文審査委員 主 査 教授 岩里 琢治
教授 相賀 裕美子
准教授 北野 潤
助教 長田 直樹
教授 海老原 史樹文 名古屋大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Behavioral responses to stress are tightly associated with physiological reaction. It is known that behavioral responses to stress have been decreased in domesticated animals during the breeding process of domestication. In house mice (*Mus musculus*), laboratory mice show lower behavioral responses to stress than wild mice given that the laboratory mice are originated in domesticated mice. However, actual genetic and molecular basis of the behavioral differences between laboratory and wild mice remain to be clarified.

Anxiety is one of the stress responses in human by expecting danger or awful situation in future. In animal models, anxiety-like behavior has been proposed as one type of behavioral responses to stress which are similar to human's anxiety responses. Previously, our group revealed that chromosome 17 is responsible for high anxiety-like behaviors using a panel of chromosome substitution (consomic) strains. A consomic strain, B6-ChrN^{MSM} (N indicates substituted chromosome number), is a mouse strain which has same genetic background as a laboratory strain C57BL/6 (B6), but only one of the chromosomes is replaced with the corresponding chromosome from a Japanese wild strain MSM/Ms (MSM). Given that B6-Chr17^{MSM} exhibits higher anxiety-like behaviors comparing to B6, it is speculated that the behavioral differences is caused by polymorphisms between B6 and MSM on the chromosome 17. However, actual causal genetic factor of the increased anxiety-like behaviors of the consomic strain had not been studied further from the chromosomal level. In order to address to the mechanisms associated with difference in anxiety-like behaviors, I decided to conduct genetic and molecular analysis using B6-Chr17^{MSM}.

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

In Part I of this article, I report on my study for positional cloning of the gene related to the increased anxiety-like behaviors in B6-Chr17^{MSM} and on the results of further molecular analysis of the gene. In order to conduct genetic analysis of anxiety-like behaviors in an open-field, I developed a series of sub-consomic strains, each of which carries partial segment of MSM-derived chromosome 17 from B6-Chr17^{MSM}. I mapped a genetic locus responsible for high anxiety-like behaviors in a region between D17Mit129 to the telomere end, the region is covered in sub-consomic T103 strain. In order to map the genetic locus with fine resolution, I developed further congenic strains from the sub-consomic T103 strain. I conducted open-field test using these congenic strains, and mapped the region into about 2.6 Mb segment at the distal part of chromosome 17, named as T116 locus. Given that a causal gene of increased anxiety-like behaviors should be located in the T116 locus, I searched for the possible candidate genes in the T116 locus from a mouse genome database. I found only one protein-coding gene, which produce pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), in the T116 locus. PACAP is a neuropeptide which increases stress responses in hypothalamus. These results indicated that PACAP is a strong candidate for the increased anxiety-like behaviors of B6-Chr17^{MSM}.

PACAP has been implicated in anxiety-like behaviors that are decreased in PACAP knockout mice and enhanced by administration of PACAP into hypothalamus. Based on these previous reports, I characterized PACAP gene further at molecular level. I revealed that there is no difference at the nucleotide sequence of the coding region in PACAP gene between MSM and B6 alleles. In contrast, expression levels of PACAP gene in hypothalamus are significantly higher in the congenic strains which have

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

MSM allele than that of B6. These results indicated that the increased behavioral responses to stress in the congenic strains might be caused by increased PACAP expression.

In Part II of this article, I report on results of my study on genetic polymorphisms related to PACAP expression levels. In the sequence characterization of PACAP gene, I found a microsatellite (TG dinucleotide repeat) marker, D17Mit123, which is highly polymorphic among strains, in the non-coding region. It has been reported that some of the TG repeats in 5'-UTR (untranslated region) act as enhancer or splicing regulator. I investigated the molecular function of the TG repeat in PACAP expression using *in vivo* and *in vitro* analyses. I found that long TG repeat length results in increased PACAP expression and also decreased alternative splicing of 5'-untranslated exon 1B in several mouse strains. These associations were further confirmed by luciferase assays using PACAP minigenes containing B6-derived (TG)₂₆ or MSM-derived (TG)₄₀ repeats. Interestingly, I found that the TG repeat lengths are clearly shorter in a group of laboratory strains than a group of wild strains, suggesting the association of the shorter TG repeat with domestication process. Taken together, I suggest that TG repeats can regulate PACAP expression via activities of enhancer and splicing regulator that might be associated with high behavioral responses to stress in wild mice.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

家畜化に伴い動物には様々な行動様式の変化が引き起こされるが、その一つとして不安様行動などストレス反応の減少がある。田邊さんはマウスを用いてその遺伝機構に迫る研究を行った。

所属研究室での先行研究により、野生マウス由来の MSM 系統が、標準実験マウス系統である C57BL/6 (B6) と比較して高い不安様行動を示すこと、および、その原因の一つは第 17 番染色体にあることがわかっていた。田邊さんは、B6 の 20 対の染色体のうち第 17 番の一部だけを MSM 型と置き換えたサブコンソミック系統 (T103, T116 など) を作製、解析することにより、第 17 番染色体の末端に近い 2.6Mb に MSM の高い不安様行動の責任領域が存在することを見つけた。その領域内に存在するタンパク質コード遺伝子は、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) 遺伝子のみであった。MSM と B6 の間に PACAP のコード配列の違いはなかったが、不安などの情動行動に重要な役割を担う視床下部で、T103 や T116 では B6 と比較して転写産物および蛋白質レベルで PACAP の発現量が多いことがわかった。これらの結果は、先行研究での、PACAP の遺伝子ノックアウトによる不安様行動の低下、および、視床下部への PACAP 投与による不安様行動の増大の報告とも合致し、MSM と B6 の不安様行動の違いが PACAP の発現量の違いで説明できる可能性が示唆された。

田邊さんは次に、PACAP の遺伝子多型が発現量に影響を与えるメカニズムについて解析を行った。第 2 イントロンに存在する TG リピートは B6 では 26 回、MSM では 40 回であったが、田邊さんはこの長さの違いが遺伝子発現に与える可能性を考えた。B6 由来の PACAP 遺伝子 (エクソン 1 の上流 2.2kb からエクソン 2 まで) に P2A-ルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクト (pTG26) と TG リピートだけを MSM 型に置き換えた pTG40 コンストラクトをそれぞれ PC12 細胞に導入してルシフェラーゼの活性と転写産物の量を解析した。その結果、両者とも pTG26 と比較して pTG40 を導入したときに有意に高いことが示された。この結果から、MSM での高い PACAP 発現量の原因の一つは、TG リピートが長いことである可能性が示唆された。

一方、PACAP には非コードのエクソン 1 B を含む 1 型と 2 型、含まない 3 型の 3 種類のスプライシングバリエントが存在する。田邊さんは、B6 と比較して T103 の脳で 3 型バリエントの割合が有意に増加していることを見つけた。PC12 細胞で pTG26 と pTG40 を発現させたところ、pTG40 発現細胞で 1 型/2 型と比較して 3 型バリエントの割合が有意に高かった。このことは、TG リピートの長さが選択的スプライシングに影響することを示唆した。3 型スプライシングバリエントは 1 型/2 型と比較して Kozak 配列との適合度が高いため、3 型では 1 型/2 型と比較して翻訳効率が高いことが期待された。田邊さんは PC12 細胞を用いてそのことと矛盾しない結果を得た。

以上をまとめると、田邊さんは、MSM と B6 マウスの遺伝学的解析により、野生由来マウスでの高い不安様行動の原因遺伝子の候補の一つとして PACAP 遺伝子を同定した。さらに、B6 と比較してイントロン 2 の TG リピートが長いことが、MSM での PACAP 遺伝

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

子発現レベルの高さと、(翻訳効率の高いことが期待される) 3型選択的スプライシング頻度の高さの原因である可能性を示した。動物の家畜化に伴う行動変化をゲノムレベルで解明することは重要な問題である。田邊さんの研究は、野生由来マウス系統と実験マウス系統の行動の違いを生み出す分子機構の一端を、フォワードジェネティクスを中心とした解析によって明らかにしたという点で意義が大きい。以上の理由から、田邊さんの博士論文は学位授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。