

氏 名 高司 雅史

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大 1294 号

学位授与の日付 平成 21 年 9 月 30 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Comparative Analysis of Expression and Sequence of  
Paraneoplastic Antigen-Like 5 (*PNMA5*) Gene

論文審査委員 主 査 教授 野田 昌晴  
教授 吉田 松生  
教授 金子 武嗣（京都大学）  
教授 山森 哲雄

## 論文内容の要旨

大脳皮質は霊長類の進化に伴って、その容量と複雑さを著しく増加させたと考えられる。大脳新皮質は主に6層構造からなり、領野とよばれる多くの領域が様々な働きをおこなっている。当研究室では大脳皮質領野の形成と機能を調べるために、霊長類の大脳皮質を用いて領野特異的に発現している遺伝子の探索および解析をおこなっている。当研究室において霊長類大脳皮質の領野特異的に発現している遺伝子の大規模な探索を restriction landmark cDNA scanning (RLCS)法によりおこなった結果、これまで報告してきた遺伝子以外に十数個の遺伝子を同定することに成功した(小松等、未発表)。その中の1つである paraneoplastic antigen-like 5 (*PNMA5*) 遺伝子は、マカクザルの前頭連合野や側頭連合野に強く発現しているが、1次視覚野での発現は弱い遺伝子として同定された。*PNMA5* 遺伝子に関する研究報告はこれまでにまったくなされておらず、また *PNMA5* 遺伝子が属すると考えられる遺伝子ファミリーの脳における機能も明らかになっていない。今回彼は、この *PNMA5* 遺伝子の詳細な発現解析および配列解析をおこなった。

まず、アフリカミドリザルの大脳皮質の各領野および様々な組織の mRNA を用いて Northern blot hybridization をおこなったところ、RLCS 法の結果と同様に大脳皮質の前頭連合野や側頭連合野に *PNMA5* の mRNA の強い発現が見られたが、1次感覚野での発現は弱く、1次視覚野で最も mRNA の発現が弱いことが観察された。また、大脳皮質以外の体組織では、精巣においてのみ mRNA の発現が観察された。マカクザルの大脳皮質における *PNMA5* の mRNA の発現を *in situ* hybridization により詳細に調べたところ、先に述べたように大脳皮質内での発現量に差があることが観察された。また大脳皮質以外でも扁桃体や海馬で強い発現が観察されたが、線条体や視床ではほとんど発現していなかった。さらに、RLCS 法や Northern blot hybridization で発現量の少なかった1次感覚野では2層にしか mRNA の発現が見られないのに対し、発現量の多かった連合野では2,3,5,6層の広い範囲で発現が見られた。これにより、マカクザルの大脳皮質における *PNMA5* の mRNA の発現量の差は、主に領野間で発現している層が異なるためであると考えられる。また、*PNMA5* の mRNA はほとんどが興奮性神経細胞に発現しており、抑制性神経細胞にはあまり発現していないことも分かった。さらに、マカクザルの *PNMA5* タンパク質に対する抗体を作製し免疫染色をおこなったところ、*PNMA5* のタンパク質は核内に局限しているおり、前頭連合野ではシグナルが見られたが1次視覚野ではシグナルが見られなかったため、*PNMA5* はタンパク質でも領野間で発現量に差があることが分かった。マカクザルにおける *PNMA5* の mRNA の領野特異的な発現は、マカクザル(旧世界ザル)より系統的にヒトから遠いサルと考えられているマーモセット(新世界ザル)でも同様に観察されたが、齧歯類のマウスの脳では mRNA の発現はまったく見られなかった。これらの結果より、*PNMA5* は霊長類特異的な核タンパク質であることが示唆され、霊長類で非常によく発達している大脳皮質連合野の機能に重要な働きをしていると推測される。

他の *PNMA* ファミリー遺伝子の mRNA の発現も同様に調べたところ、マカクザルやマーモセットでは大脳皮質の各領野に豊富に発現しており、かつ興奮性および抑制性の両方の神経細胞に発現していることが観察された。マウスの脳では、*Prma2*, *Prma3*, および *Pnma4* は mRNA の発現が観察されたが、*Pnma1* は *Pnma5* 同様にほとんど発現が観察されなかった。*PNMA5* の種特異的かつ領野特異的な発現という2つの特性は、他の *PNMA* ファミリー遺伝子では見られないことから、*PNMA5* の発現は非常に稀なパターンだと考えられる。また、マカクザルの大脳皮質における *PNMA5* の mRNA の発現パターンは、当研究室が以前に報告した retinol-binding protein (*RBP*) 遺伝子の発現パターンと非常によく似ていることから(小松等、2005)、これらの霊長類の連合野に強く発現している遺伝子は連合野の形成や機能に深く

関わっていることが期待される。

次に、種間での *PNMA5* 遺伝子の変化を調べるために、8種の霊長類と2種の齧歯類における *PNMA5* 遺伝子の配列を決定し、比較した。配列を決定した霊長類には、ヒトやチンパンジーの他に、アフリカミドリザル (旧世界ザル)、マーモセットとフサオマキザル (新世界ザル)、ワオキツネザルとオオガラゴ、ショウガラゴ (原猿)が含まれており、齧歯類ではマウスとラットの配列を決定した。その結果、*PNMA5* のアミノ酸配列はヒトとマウスでは57.0%の類似が見られた。1998年にMakalowskiとBoguskiがヒトとマウスの配列を大規模に比較したところ、アミノ酸配列は平均で86.4%の類似が見られたと報告している。この結果と比較すると、*PNMA5* のアミノ酸配列の類似度は平均より約30%も低く、あまり保存されていないという結果になる。他の *PNMA* ファミリー遺伝子群のヒトとマウス間のアミノ酸配列の類似度は、92.1%、78.7%、74.5%、および77.1%と *PNMA5* ほど低くはなかった。また、霊長類内においても、他の *PNMA* ファミリー遺伝子のアミノ酸配列の類似度の平均が91.9%であるのに対し、*PNMA5* のアミノ酸配列の類似度は80.4%と著しく低かった。

今回彼がおこなった *PNMA5* 遺伝子の発現解析および配列解析の結果から、*PNMA5* 遺伝子は霊長類の脳皮質連合野に強く発現し、さらに *PNMA5* の遺伝子配列は霊長類内においてもあまり保存されていないことが示された。これまでの研究により、脳皮質連合野は真猿亜目 (ヒトや類人猿、旧世界ザルを含む)で特に著しく発達していることが示唆されており、*PNMA5* が霊長類の連合野における高次脳機能の一部を担っているのではないかと期待される。

## 博士論文の審査結果の要旨

大脳皮質は哺乳類に於いて初めて出現し、6層構造より成るが、霊長類においてその容量と複雑さが著しく増加している。大脳皮質は、領野と呼ばれる区分からなり、各領野が様々な機能を担っている。申請者が属する脳生物研究部門では、霊長類の大脳皮質の領野間で発現に顕著な差のある遺伝子を探索し、解析を行なっている。同研究室の小松勇介博士が、アフリカミドリザルの4領野間（46野、運動野、側頭葉、視覚野）で、その発現に顕著な差のある遺伝子をRLCS(restriction landmark cDNA scanning)法により探索したものの一つに、視覚野で少なく前頭葉（46野）で高いものがあり、腫瘍随伴症候群の患者血清に対する抗原の一つとして報告されていたPNMA(paraneoplastic antigen-like)ファミリーに属するPNMA5遺伝子であることが判った。そこで、申請者は、先ず、PNMA5遺伝子の霊長類の大脳皮質における発現を*in situ hybridization*法で詳細に調べ、前頭連合野や側頭連合野等の連合性線維の投射を受ける領域の興奮性細胞で強い発現が見られ、一次感覚野では、その発現が弱いことを示した。又、特異的抗体を作成し、その発現が核に見られることを示した。大脳皮質以外では、扁桃核と海馬で発現がみられるが、他の組織では、精巣を除いてその発現はみられなかった。次に、PNMA5の発現を新世界ザルであるマーモセットで調べたところ、その発現は、大脳皮質連合野で特異的に強かったが、マウスでは、精巣のごく弱い発現以外全く観察されなかった。これらの結果は、PNMA5が霊長類大脳皮質連合野で特異的に発現する遺伝子であることを示している。

申請者は、更に、他のPNMAファミリー遺伝子(PNMA1, 2, 3, 4)の発現を調べ、マカカ属やマーモセットでは、大脳皮質の領野間での目立った差はなく、かつ興奮性、抑制性にいずれにも発現していることを示した。マウス脳では、PNMA2, 3, 4の発現が観察されたが、PNMA1の発現は観察されなかった。以上の結果は、PNMA遺伝子ファミリーの中でも、PNMA5だけが同研究室で先に報告したRBP(retinol binding protein)と良く似た、霊長類の連合野と海馬、扁桃核に特異的な発現をすることを示している。更に、RBPは、他の組織や種でも発現がみられるのに対して、PNMA5遺伝子は、霊長類連合野で特異的に発現するようにより特異的に進化した遺伝子と考えられ、今後霊長類連合野の形成や機能解析の研究の発展に寄与することが期待され、学位論文の水準を十分満していると結論した。本学位論文の研究成果の一部は、申請者を筆頭著者として、Cerebral Cortex 誌にonlineで発表されている。