

「脳を知る」

平成7年度採択研究代表者

勝木 元也

(東京大学医科学研究所 教授)

「遺伝子変換マウスによる脳機能の解明」

1. 研究の概要

脳機能の最も魅力的な研究対象はヒトである。しかし、実験的研究は難しい。とくに突然変異体を用いた分子レベルの実験的解析を、ヒトを対象に行うことは不可能である。

そこで、ヒトの脳機能に関与することが既に知られているドーパミンやセロトニンの受容体、また、それらのトランスポーターの遺伝子を破壊またはヒト型に変換したマウスを作り、これらのマウスの解析を通してヒトに外挿出来る脳機能モデル(ヒト型マウス)の創造とその解析とを目的に研究を行った。

また、遺伝子変換マウスの解析によってNMDA受容体のチロシンリン酸化がRasを介したシグナル伝達制御を受けていることを見出した。

2. 研究実施内容

1) 研究のねらい

本研究の特徴は、脳機能に重要な働きをしていると考えられている神経伝達物質受容体遺伝子をヒト型に変換したマウスを創り、その個体の表現型を解析することによって、ヒトに外挿できる動物実験システムを確立するところにある。これまでヒトとマウスでは、受容体に存在するわずかなアミノ酸配列の違いによって生理学および薬理的解析結果が異なっていた。しかし、本システムの確立によって、ヒトの受容体に作用する様々な薬剤やストレスが、ヒト型マウスにも作用し、ヒトに生じる分子反応を、本研究で得られる遺伝子変換マウスをモデルとして解析できると考えられる。もう一つの特長は、ヒトでは多重に遺伝子を欠損させることは出来ないが、マウスでは交配によってドーパミン受容体遺伝子を多重に欠損させるなど、いくつもの生体分子の相互作用を含む機能を個体において総合的に解析できることである。

また、脳に多く発現しているRasタンパク質の研究から、新たなシナプス可塑性に関わるシグナル伝達機構の存在が示唆された。そこで、本研究においてもRasを介するシグナル伝達の脳での機能についても解析する。

2) 研究実施方法

我々は、すでに自在な標的遺伝子の変換方法を確立し報告した。この方法を、神経伝達物質受容体遺伝子に適用し、標的とする遺伝子を破壊するとともに、ヒト型遺伝子と置換する。得られた突然変異体を生産し、交配により多重変異マウスを作り、生理学および薬理的解析を行う。

脳機能の遺伝的解析には、まず変異体の樹立が前提となるので、変異体の作製から取りかかる。次に、これらの変異体の行動解析および分子生物学的解析を通して、遺伝子の変換と、脳機能への遺伝子の関与を明らかにする。

3) 研究実施状況とこれまでの結果

本年度までに、マウスドーパミン受容体5種類 (D1R、D2R、D3R、D4R、D5R) およびセロトニン受容体 IB (S1BR) のゲノム遺伝子を単離し、ノックアウトマウスの作製を行った。その現在の状況は次の通りである。

ノックアウトマウス(-/-)にまで至ったもの：D1R、D2R、D4R、D5R

キメラマウスの段階：D3R

ヒト型マウス：S1BR

ノックアウト胚性幹細胞の単離の段階：DTT (ドーパミントランスポーター)
および HTT (セロトニントランスポーター)

これらのマウスに関しては、一般的な行動実験 (活動性、水迷路、恐怖条件付け、各種の運動調節能試験等) を行う。また、D1R、D2R、D4R、D5Rについては2重、3重欠損マウスを作製中である。

一方、H-ras ノックアウトマウスの研究から、細胞の増殖と分化のシグナル伝達に中心的な役割をしていると考えられている H-Ras が、海馬での長期増強の調節に深く関わっていることを見出した。この発見は、細胞増殖に関与することが明らかでない遺伝子が、増殖がないとされる神経細胞の機能にも深く関わっていることを示すものであり、その記憶への関与のメカニズムが興味深い。

以上の成果は、当然ほかの Ras タンパク質の発現や機能とも関係していると考えられるので、3種類すべての Ras(H-,N-,K-)についてノックアウトマウスを作製した。さらにそれらの多重欠損マウス、および NMDA 受容体のリン酸化に関与していると考えられている CaMKII, Fyn, Src, PKC γ などのノックアウトマウスと交配により H-Ras との二重欠損マウスを作製した。まとめると次のようになる。

H-Ras : LTP の上昇、NR2A, NR2B のリン酸化の上昇(-/-)

N-Ras : 正常(-/-)

K-Ras : 胎生致死(-/-)

H-Ras トランスジェニックマウス : K-Ras(-/-)胎生致死を正常化

H-Ras(-/-)N-Ras(-/-)二重欠損 : 正常

K-Ras(+/-)N-Ras(-/-)二重欠損：生後致死

H-Ras(-/-)K-Ras(+/-)二重欠損：正常

H-Ras(-/-)N-Ras(+/-)K-Ras(+/-) 3重欠損：半数生存

H-Ras(-/-)N-Ras(-/-)K-Ras(-/-) 3重欠損、H-Ras トランスジェニックマウス：生存

CaMKII：H-Ras と二重欠損でも表現型は不変

Fyn：H-Ras と二重欠損でも表現型は不変

Src：H-Ras と二重欠損でも表現型は不変

PKC γ ：H-Ras と二重欠損でも表現型は不変

以上のノックアウトマウスの解析は、今後電気生理学的、分子生物学的に進める必要がある。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

○Sugihara,K., Nakatsuji,N., Nakamura,K., Nakao,K., Hashimoto,R., Otani,H., Sakagami,H.,Kondo,H., Nozawa,S., Aiba,A. and Katsuki,M.

Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation.

Oncogene 17, 3427-3433 (1998)

○Yoshikawa,H., Taniguchi,S., Yamamura,H., Mori,S., Sugimoto,M., Miyado,K. Nakamura,K., Nakao,K., Katsuki,M., Shibata,N. and Takahashi,K.

Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses.

Genes to Cells 3, 685-695 (1998)

○Kimura,M., Sato,M., Akatsuka,A., Saito,S., Ando,K., Yokoyama,M. and Katsuki,M.

Overexpression of a minor component of myelin basic protein isoform (17.2kDa) can restore myelogenesis in transgenic *shiverer* mice.

Brain Res 785, 245-252 (1998)

○Nakao,K., Nakagata,K. and Katsuki,M.

Production of chimeric mice from cryopreserved blastocysts.

J Exp Anim 47, 167-171 (1998)

○Honda,H., Oda,H., Nakamoto,T., Honda,Z., Sakai,R., Suzuki,T.,Saito,T., Nakamura,K., Nakao,K., Ishikawa,T., Katsuki,M. Yazaki,Y. and Hirai,H.

Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130Cas.

Nature Genetics 19, 361-365 (1998)

他 11 件