

「脳を知る」

平成8年度採択研究代表者

三品 昌美

(東京大学大学院医学系研究科 教授)

## 「脳形成遺伝子と脳高次機能」

### 1. 研究の概要

記憶・学習の分子機構に脳神経回路網の形成・整備の機構が適用されているとの仮説を検証することを目的に、以下の成果を挙げた。1) 脊椎動物のモデル動物であるゼブラフィッシュの遺伝子クローニングと直結した変異株単離法として高頻度で欠失変異を引き起こす変異法を確立することに成功した。2) プルキンエ細胞の平行線維シナプスに局在し、小脳シナプス可塑性と運動学習に重要なグルタミン酸受容体チャンネル $\delta 2$ サブユニットは発達段階における平行線維シナプスの結合強化・安定化にも関与することを明らかにした。3) NMDA受容体チャンネルのサブユニット欠損マウスの遺伝的背景を純化し、GluR $\epsilon 1$ サブユニット欠損マウスでは文脈依存学習と海馬シナプスのLTPの閾値がともに上昇することを明らかにした。これらの結果は、NMDA受容体チャンネル依存性シナプス可塑性がある種の記憶・学習の基盤となっているとの考えを強く支持するものである。4) NMDA受容体チャンネルのGluR $\epsilon 2$ サブユニットの細胞内C末端の一部を欠失したマウスは、欠損マウスと同様に生後1日で死亡した。C末端欠失はNMDA受容体蛋白の集合を阻害し、シナプス局在を減少させることを見出した。これらの結果は、GluR $\epsilon 2$ サブユニットのC末端がPSD95蛋白との相互作用などを介してシナプス局在に重要な働きをしていることを示唆している。5) AMPA型グルタミン酸受容体チャンネルはグルタミン酸依存性イオンチャンネルとしての機能に加え、強い活性化の条件下では直接Lynチロシンキナーゼを介して下流にシグナルを伝え、BDNF誘導に関わる可能性を示唆した。

### 2. 研究実施内容

脳の形成および神経回路網整備を担う分子と記憶・学習との関係を明らかにすることを目的に、以下の研究成果を挙げた。

- 1) 脊椎動物のモデル動物であるゼブラフィッシュの遺伝子クローニングと直結した変異株単離法として高頻度で欠失変異を引き起こす変異法を確立することに成功した。ゼブラフィッシュの精子をDNA架橋剤 4, 5', 8- トリメチルソラレン (4, 5', 8

- trimethyl - psoralen、TMP) 溶液中で紫外線照射し、処理後に人工受精させると高頻度に優性致死変異を誘発することを見出した。さらに、体表縞模様の変異株をテスターとして変異誘発効率を検定したところ、30 ng/ml および 300 ng/ml TMP 処理により、それぞれ 0.5% および 2% の高い割合で変異株が得られた。したがって、TMP 変異法は極めて高い効率でゼブラフィッシュに変異を誘発することが明らかとなった。そこで、TMP で処理した 28 系統のゼブラフィッシュを半数体および三世代スクリーニングにかけた結果、12 系統の変異株を得ることに成功し、実際に TMP 変異法により効率良く変異株を単離することが出来ることを実証した。つぎに、脳・神経系に異常を有する j 5 および j 10 について詳細な解析を行った。j 5 系統は、受精後 37 - 40 時間に見られる視蓋の神経細胞の増殖分化が起きず、視蓋神経叢の形成および眼球形成が特異的に欠損していることが明らかとなった。一方、接触刺激に反応せず、動かない変異株として単離した j 10 系統は、三叉神経や Rhon-Beard 感覚神経の突起進展が異常に亢進していることを見出した。したがって、TMP 変異法は当初の目的である脳神経系の形成に関わる変異株を実際に単離する上で有効であることを示した。現在、欠失変異を指標に、正常染色体と変異染色体との間でサブトラクションを行い、原因遺伝子を直接単離する方法論の開発を進めている。

2) NMDA 型グルタミン酸受容体チャネルの  $\text{GluR}\epsilon 1$  サブユニット欠損マウスの海馬 CA1 領域のシナプス長期増強 (LTP) が減弱しているが、高頻度刺激時の刺激強度を上げることにより回復することを見出した。一方、高頻度刺激を繰り返すことにより検定した LTP の飽和レベルは、野生型マウスと同じであった。したがって、NMDA 受容体チャネル  $\text{GluR}\epsilon 1$  サブユニット欠損マウスでは、LTP 発現機構は正常であるが、海馬 CA1 領域シナプスの NMDA 受容体チャネル活性の低下により LTP 誘導の閾値が上昇していると考えられる。マウスの記憶・学習能力を行動学的に評価するためには、遺伝的背景を均一にすることが必須である。10 代以上 C57BL/6 系統と戻し交配することにより、C57BL/6 系統の遺伝的背景が 99.99% 以上に達する高い遺伝的背景の均一性を持つ系統を確立した。純系  $\text{GluR}\epsilon 1$  サブユニット欠損マウスの文脈学習能力を、条件付けチャンバーの提示時間の長さすなわち条件刺激の程度を変えて解析した。チャンバーの提示時間が充分長い時には、 $\text{GluR}\epsilon 1$  サブユニット欠損マウスと野生型の学習能力は同等であったが、チャンバーの提示時間を短くした場合には、 $\text{GluR}\epsilon 1$  サブユニット欠損マウスの学習能力が野生型マウスに比べ著しく低下することを見出した。すなわち、 $\text{GluR}\epsilon 1$  サブユニット欠損マウスでは文脈依存学習と海馬シナプスの LTP の閾値がともに上昇することを明らかにした。これらの結果は、NMDA 受容体チャネル依存性シナプス可塑性がある種の記憶・学習の基盤となっているとの

考えを強く支持するものである。

- 3) NMDA受容体チャネルの GluR $\epsilon$  2サブユニットの細胞内C末端の一部を欠失したマウスは、GluR $\epsilon$  2サブユニット欠損マウスと同様に、胃に母乳が認められず、生後1日で死亡した。GluR $\epsilon$  2サブユニットC末端欠失マウスは GluR $\epsilon$  2サブユニット欠損マウスと同様に哺乳に必要な吸引反射が消失しており、三叉神経核においてヒゲ知覚神経に対応する樽状構造（バレレット構造）の形成が認められなかった。C末端を欠失した GluR $\epsilon$  2サブユニット蛋白の発現量は、野生型 GluR $\epsilon$  2サブユニット蛋白の発現量と同等であった。海馬CA1領域での興奮性シナプス伝達に関しては、AMPA受容体チャネルによるシナプス応答には差が見られなかったが、NMDA受容体チャネル応答は野生型マウスの約4分の1に減少し、LTDの誘導も低下していることを見出した。NMDA受容体チャネルの単一チャネル機能に違いは認められないことから、GluR $\epsilon$  2サブユニットのC末端欠失はNMDA受容体チャネルのシナプス局在を減少させると考えられる。実際、海馬切片の免疫組織化学的解析から、C末端欠失マウスではシナプス部位における GluR $\epsilon$  2サブユニットの量が著しく減少していることを示した。さらに、初代培養細胞における GluR $\epsilon$  2サブユニットのシナプス局在を免疫組織化学的に解析し、C末端欠失はNMDA受容体蛋白の集合を阻害し、シナプス局在を減少させることを見出した。これらの結果は、GluR $\epsilon$  2サブユニットのC末端がPSD95蛋白との相互作用などを介してシナプス局在に重要な働きをしていることを示唆している。
- 4) NMDA受容体チャネルはシナプスにおいて強固な複合体を形成しているため、従来の免疫組織化学法では組織分布を正しく解析することが困難であった。GluR $\epsilon$  1、GluR $\epsilon$  2および GluR $\zeta$  1サブユニットに対する特異抗体を作製し、組織切片の前処理による新たな免疫組織化学法を考案した。NMDA受容体チャネル依存性のシナプス可塑性が見い出される海馬CA1野の各層およびCA3野の分子層、放射層、上昇層にはNMDA受容体チャネルサブユニットが豊富に分布しているが、シナプス可塑性がNMDA受容体チャネル非依存性であるシナプスが集積するCA3野の透明層にはサブユニットの局在が乏しいことを明らかにし、錐体細胞内でのNMDA受容体チャネルサブユニットの局在がシナプス特性を決定していることを示唆した。さらに、海馬CA3野錐体細胞の頂上樹状突起に存在する交連/連合繊維入力によるシナプスでは、NMDA受容体チャネル GluR $\epsilon$  1サブユニットの欠損によりNMDA受容体応答およびシナプス長期増強（LTP）が低下した。一方、基底樹状突起に存在する fimbrial (Fim) 入力によるシナプスでは、GluR $\epsilon$  2サブユニットを片方の染色体で欠失させたヘテロ接合マウスで NMDA受容体応答およびLTPが低下することを見い出した。すなわち、海馬CA3野錐体細胞は多様なNMDA受容体チャネルの分子種をシナプスにより使い分けていることが

示唆された。

- 5) グルタミン酸受容体チャネル  $\delta 2$  サブユニットは小脳プルキンエ細胞に特異的に発現し、プルキンエ細胞の平行線維シナプスに局在する分子である。GluR  $\delta 2$  サブユニット欠損により、小脳シナプス可塑性が消失し運動学習が低下するとともに平行線維シナプスが著明に減少する。平行線維シナプスの形成過程における GluR  $\delta 2$  サブユニットの機能的役割を追求する目的で、野生型マウスおよび GluR  $\delta 2$  サブユニット欠損マウスを形態学的に解析した。プルキンエ細胞の産生や細胞移動は正常に起こり、樹状突起の形態分化や棘突起の形成も正常に起きるが、GluR  $\delta 2$  サブユニット欠損は棘突起と平行線維終末との間の結合率を選択的に低下させることを見出した（結合率：野生型 100%、ノックアウト 63%）。発達段階において、このシナプス結合率の低下は生後第2週より顕在化した。GluR  $\delta 2$  サブユニットは生後第1週まではプルキンエ細胞の細胞体や樹状突起に広く分布しているのに対して、生後第2週以降はシナプス局在が確立することと以上結果から、GluR  $\delta 2$  サブユニットは発達段階における平行線維シナプスの結合強化・安定化に関与することが明らかとなった。
- 6) 免疫沈降や融合蛋白との結合実験から小脳のAMPA型グルタミン酸受容体チャネルのC末端側細胞質領域にはLynチロシンキナーゼがSH領域を介して相互作用していることを見出した。さらに、小脳培養細胞を  $100 \mu\text{M}$  AMPAで刺激することにより、Lynチロシンキナーゼのリン酸化が引き起こされ、MAPキナーゼが活性化されることを示した。同時に、これらの刺激はBDNFの遺伝子発現を促進することを見出した。これらの結果は、AMPA型グルタミン酸受容体チャネルはグルタミン酸依存性イオンチャネルとしての機能に加え、強い活性化の条件下では直接Lynチロシンキナーゼを介して下流にシグナルを伝え、BDNF誘導に関わる可能性を示唆した。

### 3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- M. Taniguchi, M. Sanbo, M. Watanabe, I. Naruse, M. Mishina and T. Yagi;  
Efficient production of Cre-mediated site-directed recombinants through the utilization of the puromycin resistance gene, *pac*: a transient gene-integration marker for ES cells. *Nucleic Acids Res.*, 26, 679-680 (1998)
- M. Watanabe, M. Fukaya, K. Sakimura, T. Manabe, M. Mishina and Y. Inoue;  
Selective scarcity of NMDA receptor channel subunits in the stratum lucidum (mossy fiber-recipient layer) of the hippocampal CA3 subfield. *Eur. J. Neurosci.*, 10, 478-487 (1998)
- H. Ando and M. Mishina; Efficient mutagenesis of zebrafish by a DNA cross-

- linking agent. *Neurosci. Lett.*, 244, 81-84 (1998)
- I. Ito, K. Akashi, K. Sakimura, M. Mishina and H. Sugiyama; Distribution and development of NMDA receptor activities at hippocampal synapses examined using mice lacking the  $\epsilon$  1 subunit gene. *Neurosci. Res.*, 30, 119-123 (1998)
- N. Kohmura, K. Senzaki, S. Hamada, N. Kai, R. Yasuda, M. Watanabe, H. Ishii, M. Yasuda, M. Mishina and K. Yagi; Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at synaptic complex. *Neuron*, 20, 1137-1151 (1998)
- T. Yamakura, K. Sakimura, M. Mishina and K. Shimoji; Sensitivity of the *N*-methyl-D-aspartate receptor channel to butyrophenones is dependent on the  $\epsilon$  2 subunit. *Neuropharmacology*, 37, 709-717 (1998)
- Y. Kiyama, T. Manabe, K. Sakimura, F. Kawakami, H. Mori and M. Mishina; Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor  $\epsilon$  1 subunit. *J. Neurosci.*, 18, 6704-6712 (1998)
- I. Mizuta, M. Katayama, M. Watanabe, M. Mishina and K. Ishii; Developmental expression of NMDA receptor subunits and the emergence of glutamate neurotoxicity in primary cultures of murine cerebral neurons. *Cell. Mol. Life Sci.*, 54, 721-725 (1998)
- H. Mori, T. Manabe, M. Watanabe, Y. Satoh, N. Suzuki, S. Toki, K. Nakamura, T. Yagi, E. Kushiya, T. Takahashi, Y. Inoue, K. Sakimura and M. Mishina; Role of the carboxyl-terminal region of the GluR  $\epsilon$  2 subunit in synaptic localization of the NMDA receptor channel. *Neuron*, 21, 571-580 (1998)
- Y. Munemoto, H. Kuriyama, T. Doi, K. Sato, A. Matsumoto, J. Sugatani, H. Cho, M. Komeda, R. A. Altschuler, M. Kitajiri, M. Mishina and T. Yamashita; Auditory pathway and auditory brainstem response in mice lacking NMDA receptor  $\epsilon$  1 and  $\epsilon$  4 subunits. *Neurosci. Lett.*, 251, 101-104 (1998)
- T. Kitahara, N. Takeda, A. Uno, T. Kubo, M. Mishina and H. Kiyama; Unilateral labyrinthectomy downregulates glutamate receptor  $\delta$  - 2 expression in the rat vestibulocerebellum. *Mol. Brain Res.*, 61, 170-178 (1998)
- E. Morikawa, H. Mori, Y. Kiyama, M. Mishina, T. Asano and T. Kirino; Attenuation of focal ischemic brain injury in mice deficient in the  $\epsilon$  1 (NR2A) subunit of NMDA receptor. *J. Neurosci.*, 18, 9727-9732 (1998)
- T. Hayashi, H. Umemori, M. Mishina and T. Yamamoto; The AMPA receptor

interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. *Nature*, 397, 72-76 (1999)

○T. Furuyashiki, K. Fujisawa, A. Fujita, P. Madaule, S. Uchino, M. Mishina, H. Bito and S. Narumiya; Citron, a Rho-target, interacts with PSD-95/SAP-90 at glutamatergic synapses in the thalamus. *J. Neurosci*, 19, 109-118 (1999)

○S. Kawamoto, S. Hattori, S. Uchino, M. Mishina and K. Okuda; Expression of NMDA receptor channel subunit proteins using Baculovirus and Herpesvirus vectors. *Methods in Molecular Biology: NMDA receptor Protocols*, (Li, M., ed), 128, 19 - 32, Humana Press, Totowa. (1999)