

「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. 研究実施の概要

本研究は、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ために、ゼブラフィッシュ分子遺伝学による脳形成遺伝子探索系を開発し、同時に脳の部位時期特異時標的遺伝子組換え系を開発することを目的としている。標的遺伝子組換えにより作成した遺伝子欠損マウスの解析から、終脳特異的細胞接着分子テレンセファリンは報酬を誘因とする学習と海馬シナプス可塑性に関与すること、多様な NMDA 受容体チャネルサブユニットの中で GluR ϵ 2 が特異的に驚愕反射を制御していることを見出した。また、小脳プルキニエ細胞特異的グルタミン酸受容体 δ 2 欠損マウスの解析により瞬目反射の条件付けにおいて条件刺激と無条件刺激とのタイミングに応じて脳内のシステムが使い分けられていることを明らかにした。脳の形成遺伝子探索系として、欠失変異を引き起こす DNA 架橋剤 TMP を用いたゼブラフィッシュの高頻度変異法を開発し、TMP 変異法により単離した変異株の中から、視蓋神経叢の形成不全や感覚神経突起の異常伸長を示す神経系の変異株を選び、RDA(representational difference analysis) 法を適用して正常ゲノムと変異ゲノム間でサブトラクションを行い、原因遺伝子を含む数百kbの遺伝子領域を単離した。脳の部位時期特異時標的遺伝子組換え系として、学習能力の高い C57BL/6 系統の胚幹細胞を用いる標的遺伝子組換え系を実用化し、変異プロゲステロン受容体のホルモン結合領域と遺伝子組換え酵素 Cre リコンビナーゼの融合蛋白遺伝子を脳部位特異的遺伝子の下流に導入することにより特定の神経細胞特異的にかつ時期特異的に遺伝子をロックアウトすることを可能にした。これらの系を用いて脳神経系の形成に関わるグルタミン酸受容体、神経栄養因子受容体、細胞接着分子、転写因子の遺伝子に組換え酵素 Cre の標的配列を導入したマウスを作成した。

2. 研究実施内容

- (1) 終脳特異的に発現する細胞接着分子テレンセファリンの欠損マウスにおいて、海馬シナプスの長期増強が亢進し、高架式十字迷路や Water finding test の成績が向上していることを見出した。一方、水迷路学習や文脈依存学習の能力は野生

マウスと同等であった。したがって、終脳特異的細胞接着分子テレンセファリンは報酬を誘因とする学習と海馬シナプス可塑性に関与することが明らかとなった。

- (2) NMDA 型グルタミン酸受容体チャネル $\text{GluR}\epsilon 2$ サブユニットのヘテロ欠損マウスは驚愕反射が亢進していることを見出した。 $\text{GluR}\epsilon 2$ は驚愕反射の基本回路には発現していないことから、驚愕反射の制御に関与することが示唆された。一方、 $\text{GluR}\epsilon 1$, $\text{GluR}\epsilon 3$, $\text{GluR}\epsilon 4$ のヘテロ欠損マウスは異常を示さず、 $\text{GluR}\epsilon 1$ と $\text{GluR}\epsilon 4$ のホモ欠損マウスでも若干の亢進を観察したのみであったことから、多様な NMDA 受容体チャネルサブユニットの中で $\text{GluR}\epsilon 2$ が特異的に驚愕反射を制御していることが明らかとなった。
- (3) 小脳プルキニエ細胞に特異的に発現しているグルタミン酸受容体 $\delta 2$ は小脳可塑性に必須である。 $\text{GluR}\delta 2$ 欠損マウスの運動学習能力を瞬目反射と音との連合学習で解析したところ、条件刺激と無条件刺激とを同じタイミングで与える Delay パラダイムにおいて著しく障害されていたが、条件刺激と無条件刺激との間に時間的間隔を設ける Trace パラダイムでは正常な学習を示すことを見出した。逆に、NMDA 型グルタミン酸受容体チャネル $\text{GluR}\epsilon 1$ サブユニット欠損マウスは Delay パラダイムはほぼ正常であるが Trace パラダイムで障害を示すことを示した。したがって、瞬目反射の条件付けにおいて条件刺激と無条件刺激とのタイミングに応じて脳内のシステムが使い分けられていることが明らかとなった。
- (4) グルタミン酸受容体 $\delta 2$ のシグナル伝達機構を明らかにするために、細胞質ドメインに結合する蛋白を探索し、新規分子デルフィリンとタンパク質チロシン脱リン酸化酵素 PTPMEG を単離した。
- (5) プロゲステロン受容体の制御領域と組換え酵素 Cre リコンビナーゼを融合させた CrePR 遺伝子を小脳顆粒細胞ならびに小脳プルキニエ細胞特異的に誘導発現する B6 系統マウスを得た。
- (6) マウスの学習行動は遺伝的背景により大きく影響を受ける。標的遺伝子組換えに広く用いられている ES 細胞は学習能力が低い 129 系統に由来しているため、標的遺伝子組換えを脳研究に適用するには重大な欠陥を孕んでいる。我々は、学習能力に優れた C57BL/6 系統マウスに由来する ES 細胞を用いて標的遺伝子組換えを行う系を確立することによりこの問題点を克服することに成功した。シナプス可塑性あるいはシナプス形成の鍵分子と考えられる NMDA 型グルタミン酸受容体、神経栄養因子受容体、細胞接着分子、転写因子の遺伝子に組換え酵素 Cre の標的配列を導入した組換え B6ES 細胞を単離し、キメラマウスから組換えマウスを作成し、学習能力に優れた B6 マウスに遺伝的背景を統一した標的マウスを

得た。

- (7) 組換え ES 細胞の選択に用いた薬剤選択マーカー遺伝子が標的遺伝子の発現に影響を与える可能性を排除するために、FLP 組換え酵素を発現する B6 系統のトランスジェニックマウスを得た。標的マウスと FLP マウスを掛け合わせることにより、組換え酵素 Cre の標的配列を導入した標的遺伝子「神経栄養因子受容体、細胞接着分子」より、薬剤選択マーカー遺伝子を除去した。
- (8) TMP 変異法により得た脳神経系の変異株 j5 および j12 について、Representative difference analysis (RDA) 法を適用することにより、原因遺伝子から 0.1 - 0.2cM の遺伝学的距離に位置する多型マーカーを単離し、遺伝地図を作成し、さらにこれらのマーカーを用いてゼブラフィッシュ YAC, BAC, PAC ライブラリーをスクリーニングすることにより、標的遺伝子座を含む物理的地図を構築した。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Inoue, M., Mishina, M. and Ueda, H.: Enhanced nociception by exogenous and endogenous substance P given into the spinal cord in mice lacking NR2A/ ϵ 1, an NMDA receptor subunit. *Br. J. Pharmacol.* 129, 239-241 (2000)

Ito, I., Kawakami, R., Sakimura, K., Mishina, M. and Sugiyama, H.: Input-specific targeting of NMDA receptor subtypes at mouse hippocampal CA3 pyramidal neuron synapses. *Neuropharmacology* 39, 943-951 (2000)

Minami, T., Okuda-Ashitaka, E., Mori, H., Sakimura, K., Watanabe, M., Mishina, M. and Ito, S.: Characterization of nociceptin/orphanin FG-induced pain responses in conscious mice: Neonatal capsaicin treatment and N-methyl-D-aspartate receptor GluR ϵ subunit knockout mice. *Neuroscience* 97, 133-142 (2000)

Hironaka, K., Umemori, H., Tezuka, T., Mishina, M. and Yamamoto, T.: The protein-tyrosine phosphatase PTPMEG interacts with glutamate receptor δ 2 and ϵ subunits. *J. Biol. Chem.* 275, 16167-16173 (2000)

Matsuda, I. and Mishina, M.: Identification of a juxtamembrane segment of the glutamate receptor δ 2 subunit required for the plasma membrane localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 565-571 (2000)

Yamakura, T., Sakimura, K. and Shimoji, K.: N-methyl-D-aspartate receptor channel block by meperidine is dependent on extracellular pH. *Anesth. Analg.* 90: 928-932 (2000)

Tanaka J, Nakagawa S, Kushiya E, Yamasaki M, Fukaya M, Iwanaga T, Simon MI, Sakimura K, Kano M, and Watanabe M.: Gq protein α subunits G α q and

G α 11 are localized at postsynaptic extra-junctional membrane of cerebellar Purkinje cells and hippocampal pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.* 12, 781-792 (2000)

Yamakura, T., Sakimura, K. and Shimoji, K.: The stereoselective effects of ketamine isomers on heteromeric *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. *Anesth. Analg.* 91, 225-229 (2000)

Nakamura, K., Manabe, T., Watanabe, M., Mamiya, T., Ichikawa, R., Kiyama, Y., Sanbo, M., Yagi, T., Inoue, Y., Nabeshima, T., Mori, H. and Mishina M.: Enhancement of hippocampal LTP, reference memory and sensorimotor gating in mutant mice lacking a telencephalon-specific cell adhesion molecule. *Eur. J. Neurosci.* 13, 179-189 (2001)

Nakazawa, T., Komai, S., Tezuka, T., Hisatsune, C., Umemori, H., Semba, K., Mishina, M., Manabe, T. and Yamamoto, T.: Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR ϵ 2 (NR2B) subunit of the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 693-699 (2001)

Miyamoto, Y., Yamada, K., Noda, Y., Mori, H., Mishina, M. and Nabeshima, T.: Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neural systems in mice lacking NMDA receptor ϵ 1 subunit. *J. Neurosci.* 21, 750-757 (2001)

Uchino, S., Nakamura, T., Nakamura, K., Nakajima-Iijima, S., Mishina, M., Kohsaka, S. and Kudo, Y.: Real-time two-dimensional visualization of ischemia-induced glutamate release from hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.* 13, 670-678 (2001)

Kishimoto, Y., Kawahara, S., Mori, H., Mishina, M. and Kirino, Y.: Long-trace interval eyeblink conditioning is impaired in mutant mice lacking the NMDA receptor subunit ϵ 1. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1221-1227 (2001)

Kishimoto, Y., Kawahara, S., Suzuki, M., Mori, H., Mishina, M. and Kirino, Y.: Classical eyeblink conditioning in glutamate receptor subunit δ 2 mutant mice is impaired in the delay paradigm but not in the trace paradigm. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1249-1253 (2001)

Kitayama, K., Abe, M., Kakizaki, T., Honma, D., Natsume, R., Fukaya, M., Watanabe, M., Miyazaki, J., Mishina, M. and Sakimura, K.: Purkinje cell-specific and inducible gene recombination system generated from C57BL/6 mouse ES cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 1134-1140 (2001)