

〔別紙 1〕

論文の内容の要旨

論文題目 遺伝子改変マウスを用いた mGluR1 遺伝子による運動制御機構の解析

指導教官 甲斐知恵子 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程 病因・病理学専攻

市瀬 多恵子

グルタミン酸は中枢神経の主要な興奮性神経伝達物質で、その受容体は、シナプス可塑性や記憶、学習と深く関与している。1994年に2つのグループによりmGluR1遺伝子欠損マウス〔mGluR1 (-/-)マウス〕が作成され、解析された。mGluR1 (-/-)マウスは、海馬長期増強の欠損、海馬依存性の記憶のゆるやかな障害、歩行失調、登上線維シナプス除去における障害、小脳長期抑圧の欠損、自発運動能および協調運動能の低下、小脳依存性の連合学習における障害を示した。しかし、mGluR1 (-/-)マウスは、脳全域でmGluR1遺伝子が欠損しているため、見られた表現型が、脳のどの領域、もしくはどの細胞のmGluR1遺伝子の機能を反映しているのか結論付けることは難しかった。そこで、小脳唯一の出力系であるプルキンエ細胞に着目し、mGluR1による運動制御機構を解析するため、プルキンエ細胞のみでmGluR1遺伝子を発現するマウスを作成し、解析することを計画した。

1. mGluR1-rescue マウスの作成

プルキンエ細胞特異的な発現を示すことが知られている L7 タンパク質のプロモーターとラット mGluR1a 遺伝子の cDNA を用いてトランスジーンを構築し (L7-mGluR1)、マウス前核期受精卵にマイクロインジェクションして 8 系列のトランスジェニックマウスを作成した (L7M-1~8)。5 系列の L7M トランスジェニックマウスにおいて RT-PCR を行ったところ、L7M-6 と L7M-7 の 2 系列で小脳特異的なトランスジーンが発現があることが分かった。交配により、mGluR1 (-/-)マウスに L7M トランスジーンを導入したところ [mGluR1 (-/-); L7M (Tg/+)マウスとする]、mGluR1 (-/-)マウスに見られた企図振戦や歩行失調が、mGluR1 (-/-); L7M-6 (Tg/+)マウスではわずかに、mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスでは見かけ上完全に回復していた。本来、mGluR1 は嗅球、大脳皮質、視床、海馬、小脳など脳全域で発現しているが、免疫染色を行い mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスにおける mGluR1 の発現を調べたところ、小脳プルキンエ細胞特異的であることが確認された。

2. 登上線維シナプス除去

生後まもなくの幼若動物では 1 個のプルキンエ細胞が複数の登上線維支配を受けている。発達につれ過剰な登上線維が淘汰され、マウスでは生後 20 日で成熟型の 1 対 1 の結合が完成し、成熟した機能的神経回路網が形成される。mGluR1 (-/-)マウスは、小脳の発生に伴う登上線維の淘汰が正常に起こらず、成熟しても約 1/3 のプルキンエ細胞が登上線維の多重支配を受けたままであった。一方、mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスでは、登上線維シナプス除去が正常に起き、プルキンエ細胞と登上線維の間で 1 対 1 の結合が観察された。

3. 長期抑圧

プルキンエ細胞は平行線維と登上線維の 2 つの経路を介して興奮性のシナプス入力を受けているが、この 2 つの入力が時間的に一致して、反復して起きたとき、平行線維とプルキンエ細胞間のシナプスに伝達効率の持続的低下、すなわち長期抑圧(LTD)が生じる。プルキンエ細胞で起こる長期抑圧は、小脳を必要とする運動学習の細胞レベルでのメカニズムであると考えられているが、mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスでは、mGluR1 (-/-)マウスで欠損して

いた長期抑圧が回復していた。

4. 歩行

四足にインクを付け歩行時の足跡をとると、mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスは、野生型マウスと同様、正常であった。mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスの歩行をさらに仔細に解析するために、マウスの頭を固定し、流れベルト上で自発運動させ、左右両肢の接地するタイミングを調べた。mGluR1 (-/-)マウスでは、左右両肢の接地するタイミングは完全に乱れていた。一方、mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスは、野生型マウス同様、正常な左右両肢の接地リズムを示し、このことにより、mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスの歩行は野生型マウス同様、回復していることが明らかとなった。

5. 自発運動能

オープンフィールドで自発運動能を測定すると、mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスの総歩行距離は野生型マウスと差が見られなかった。このことにより、mGluR1 (-/-)マウスで見られた自発運動能の低下は、歩行失調が原因であることが分かった。

6. 協調運動

ローターロッドテストで mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスの協調運動能を調べると、mGluR1 (-/-)マウスと比較して回復しているものの完全ではなかった。mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスの小脳におけるトランスジェンの発現量は野生型マウスに比べ少なかったため、mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウス同士を交配し、トランスジェンをホモ型に持つマウスを作成した。mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/Tg) マウスの小脳における mGluR1 の発現量をウエスタンブロットティングにより解析したところ、ヘテロ型の2倍であった。mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/Tg) マウスを用いてローターロッドテストを行ったところ、自発運動能は野生型マウス同様、完全に回復していた。

mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+) マウスあるいは mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/Tg) マウスでは、mGluR1 (-/-)マウスで見られた、歩行失調、登上線維シナプス除去および小脳 LTD における

障害、協調運動能の低下が野生型マウス同様回復していた。このことから、これらの制御には、小脳以外の脳領域や、平行線維が由来する顆粒細胞に抑制性入力をしているゴルジ細胞、登上線維が由来する延髄下オリブ核などで発現している mGluR1 は関与しておらず、小脳プルキンエ細胞で発現している mGluR1 が必要十分であることが分かった。

また、既に作成されている遺伝子欠損マウスの解析結果から、登上線維シナプス除去が正常に起きず、プルキンエ細胞が登上線維による多重支配を受けたままだと、協調運動能に障害がでることが考えられた。mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+) マウスは、登上線維シナプス除去は正常であったが、協調運動能には障害が残った。このことから、協調運動が正常に行えるようになるためには、登上線維シナプス除去が正常に起こること以外に何か他のメカニズムが存在し、このメカニズムは mGluR1 の発現量により規定されていることが明らかとなった。