

〔別紙 2〕

## 審査の結果の要旨

氏名 市瀬 多恵子

本論文は、遺伝子改変技術および発生工学的手法を用いて、小脳プルキンエ細胞でのみ mGluR1 遺伝子を発現するマウスを作成し、解析することで、タイプ I 代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptor subtype I, mGluR1) のプルキンエ細胞における生理的役割について考察している。

1994 年に作成された mGluR1 遺伝子欠損マウス [mGluR1 (-/-)マウス] は、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。そのため、mGluR1 は、登上線維シナプス除去や小脳 LTD、歩行や協調運動の制御において重要な役割を担う分子であることが考えられた。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、本論文では、小脳唯一の出力系であるプルキンエ細胞でのみ mGluR1 遺伝子を発現するマウスを作成し、mGluR1 による運動制御機構を解析することを試み、下記の結果を得た。

1. L7 タンパク質のプロモーターとラット mGluR1a cDNA を用いてトランスジーンを構築した (L7-mGluR1)。マウス前核期受精卵へのマイクロインジェクションによりトランスジーンを導入して、小脳特異的なトランスジーンを発現を示す 2 系列のトランスジェニックマウスを作成した (L7M-6、L7M-7)。交配により、mGluR1 (-/-)マウスに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、L7M-6 系列の mGluR1 (-/-); L7M-6 (Tg/+)マウスではわずかに、L7M-7 系列の 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. mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスでは、mGluR1 (-/-)マウスで見られた、登上線維シナプス除去および小脳 LTD の異常が正常に回復していた。このことから、登上線維シナプス除去および小脳 LTD の制御には、小脳プルキンエ細胞で発現している mGluR1 が必要かつ十分であることが分かった。
3. mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスの歩行を、歩行時の足跡、左右両肢の接地するタイミ

ングを指標として解析すると、野生型マウスと同様、正常であることが分かった。また、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。次に、ロータールットテストでmGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスおよびmGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/Tg)マウスの協調運動能を調べた。mGluR1 (-/-); L7M-7 (Tg/+)マウスの協調運動能は、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/Tg)マウスの協調運動能は、野生型マウス同様、完全に回復していた。これらの結果から、mGluR1 (-/-)マウスで観察された、歩行失調および協調運動能における障害は、プルキンエ細胞で発現している mGluR1 が欠損したために生じたもので、他の脳領域で発現している mGluR1 は関与していないことが明らかになった。また、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。このことから、小脳における mGluR1 の発現量に依存する、協調運動能の制御機構の存在が示唆された。

4. 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出るということが考えられていた。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、協調運動の正常な制御には、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。

以上、本論文は、mGluR1 (-/-)マウスの解析では結論付けることの出来なかった、小脳プルキンエ細胞における mGluR1 の、登上線維シナプス除去、小脳 LTD、歩行、強調運動における必要十分性を明らかにした。本研究は、今後の脳機能の解析に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。