

論文の内容の要旨

論文題目：The enhanced spontaneous locomotor activity of the
neostriatum - dominant NMDA receptor deficient mice
新線条体優位な NMDA 受容体欠損マウスにおける自発運動の上昇

指導教官： 三品 昌美 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 11 年 4 月 入学
医学博士課程
機能生物学専攻
氏名： 片岡 宏隆

新線条体は、自発運動の制御に重要な役割を果たしている。新線条体の活動は、大脳皮質からのグルタミン酸を含有する投射によって引き起こされる。このグルタミン酸による伝達は、グルタミン酸受容体によって行われる。このグルタミン酸受容体の中でも、N-methyl-D-aspartate 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体)は、coincidence detection を行うことで神経伝達や神経可塑性を引き起こすことから特に注目が集まっている。しかしながら、グルタミン酸は脳内の多くの部位で伝達物質として使用されているため、薬理学的手法や従来の遺伝子欠損法を用いた研究でのアプローチが難しく、その自発運動に対する役割が明確では無い。

このため、本研究では第二世代の遺伝子欠損法 (Cre/loxP system) を用いて、まず新線条体優位に遺伝子欠損を行うシステムの構築を行い、新線条体における NMDA 受容体の役割を個体レベルで解析した。このシステムには、遺伝子組み換え酵素 Cre recombinase を線条体優位に発現するマウスと、Cre recombinase が認識する loxP 配列を NMDA 受容体の必須サブユニットである *GluR ζ 1* 遺伝子に挿入したマウスが必要である。そこで、これまでの研究から線条体優位に発現することが知られている G protein γ 7 subunit (*Gng7*) 遺伝

子の翻訳開始メチオニンコドンの直下に、*Cre* 遺伝子を挿入したマウス (*Gng7^{ncr}*)を遺伝子標的法を用いて作成した。*Gng7^{ncr}* マウスにおける、*Cre recombinase* 依存的な遺伝子組み換え部位を検定するために、*Cre* 活性依存的に β -galactosidase を発現するマウス (*CAG-CAT-Z*)と掛け合わせた。 β -galactosidase 活性は、新線条体と鼻結節に強く認められ、大脳皮質五層と海馬台で弱い活性が認められた。

この結果は、*Gng7^{ncr}* マウスが新線条体優位に遺伝子組み換えを起こすマウスであることを示唆する。この *Gng7^{ncr}* マウスを用いて、*NMDA* 受容体を欠損させるために、*GluR ζ 1* 遺伝子のエキソン 19, 20 を挟む形で、二つの *loxP* 配列を導入したマウス (*GluR ζ 1^{flx}*)を遺伝子標的法で作成した。*Gng7^{ncr}* マウスと *GluR ζ 1^{flx}* マウスを掛け合わせて、*Gng7^{ncr};GluR ζ 1^{flx/flx}* (*neostriatum - GluR ζ 1 KO*)マウスを作成した。生後一週において、*neostriatum - GluR ζ 1 KO* マウスの *GluR ζ 1 mRNA* は、新線条体優位に欠損していた。抗 *GluR ζ 1* 抗体を用いて免疫組織化学的解析を行ったところ、*GluR ζ 1* 蛋白質は、生後二週までに新線条体優位に消失することが明らかになった。*neostriatum - GluR ζ 1 KO* マウスは、ケージの蓋の上に餌を置く飼育条件下において、生後3週以降に死亡し始め、生後5週までには全て死亡した。体重を測定したところ、生後2週以降に *neostriatum - GluR ζ 1 KO* マウスの体重が、コントロールに比べて優位に減少していることが明らかになった。これらの結果は、餌を摂取していないか代謝に異常があるために、死亡率が増加した可能性を示唆している。餌の摂取不良による可能性を検討するために、より餌の摂取が容易であると考えられる床の上に餌を置いた条件下で、マウスを飼育した。この飼育条件下においては、全ての変異マウスが、5週以降まで生き残った。体重は、コントロールに比べて優位に少なかっ

たが、餌をケージの蓋の上に置いた条件で飼育した変異マウスよりは明らかに体重が増加していた。この結果は、*neostriatum - GluR ζ 1 KO* マウスの増加した死亡率が、餌の摂取の不良にあることを示しており、摂取不良は餌を食べるというモチベーションの不良によるものではなく、餌を食べるための運動に何らかの異常があるためである可能性を示唆する。

neostriatum - GluR ζ 1 KO マウスの運動機能を調べるために、2時間の Open field テストを行った。その結果、水平方向の総運動量が4倍程度増加していることが明かとなった。5分ごとの行動量をグラフ化したところ、明らかに運動量が増加しているのは、測定開始後15分から60分までの間であることが明らかになった。従って、この変異体マウスは、常に運動量が亢進しているマウスではなく、新規環境依存的に運動量の増加が誘導される自発運動亢進マウスであると考えられた。

自発運動量の亢進が、NMDA 受容体の機能が欠損したことによるのか、NMDA 受容体が欠損したことによって起きた二次的な変化によるものなのかを検討するために、組織化学的な解析を行った。ニッスル染色によって、新線条体、大脳皮質、視床、海馬等の皮質—線条体回路に関わる脳部位が十分に形成されていることが明かとなった。高倍率による観察から、コントロールマウスと同様、新線条体に多数の神経細胞様の細胞とグリア細胞様の細胞が存在していることが明かとなった。次に、大脳皮質からのグルタミン酸伝達に必須な蛋白質の発現を免疫組織化学法により検討した。グルタミン酸を含むシナプス小胞のマーカでありシナプス小胞へのグルタミン酸の輸送に必須な VGlut1 の発現と、 α -amino-hydroxy-5-methylisoxazole-propionic acid (AMPA) 型 グルタミン酸受容体 α 1 の新線条体における分布は、コントロールマウスに比べて変化が無かった。新線条体の主な投射神経細胞である中程度の有棘細胞は、GABA を伝達物質として使用しているため、その合成酵素である Glutamic acid decarboxylase (GAD) の mRNA レベルでの発現を *in situ* hybridization 法を用いて調べた。これまでに知られている2種類の GAD (GAD65 と GAD67) の発現は、20% 程度減少していたものの明らかに発現

していた。免疫組織化学による解析からも、GAD65/67 蛋白質が *neostriatum - GluR ζ 1 KO* マウスの新線条体において発現していることが確認された。次に、皮質 - 新線条体回路の調節に重要であり、自発運動量の調節に重要である Dopamine 作動系が、NMDA 受容体の欠損によって変化し、その結果、*neostriatum - GluR ζ 1 KO* マウスの自発運動量亢進を引き起こしている可能性を検討するため、Dopamine とその代謝物の測定とドーパミン受容体の発現を調べた。*neostriatum - GluR ζ 1 KO* マウスの Dopamine 含有量は、コントロールと比べて変化が無かったが、Dopamine の代謝物である Homovanillic acid は 20 % 程度減少していた。Dopamine D1 受容体と Dopamine D2 受容体 mRNA の発現量は、それぞれ 20 % 前後減少していた。これらの結果は、Dopamine 作動系の活動が、新線条体において減弱していることを示唆している。Dopamine 作動系の活動の減弱は、運動量の減少になるので、*neostriatum - GluR ζ 1 KO* マウスの自発運動量の増加は、Dopamine 作動系の異常によって説明されないと考えられた。このため、*neostriatum - GluR ζ 1 KO* マウスの新規環境依存的な自発運動量の上昇は、NMDA 受容体の欠損によって起る二次的な異常によるものではなく、NMDA 受容体の欠損自体によるものである可能性が高いと考えられた。

今回の結果は、新線条体の NMDA 受容体の機能が、外部からの新規刺激に対して適切に運動量を制御するために重要である可能性が示唆している。運動量の上昇は、精神分裂病、ハンチントン舞踏病あるいは注意欠陥多動障害のマウスモデルにおいて、重要な指標である。このため、*neostriatum - GluR ζ 1 KO* マウスが、これらの疾患と新線条体の NMDA 受容体の関わりを解析するために重要であり、これらの疾患の発生機序、創薬、治療法の確立に新たな知見を与える可能性がある。