

リアノジン受容体欠損マウスにおけるシナプス可塑性、及び行動・学習

二木 啓

1. はじめに

カルシウムは細胞内二次情報伝達分子として、多様な生理反応を惹起するが、その機能の多様性は、細胞の種類や発生におけるステージはもとより、カルシウムの細胞質への流入経路や、濃度変化の時間空間的ダイナミクスにも起因すると考えられる。当プロジェクトC（細胞機能分子制御）グループでは、このカルシウムの機能的多様性に着目し、その個体レベルでの高次機能や、それを生み出すカルシウムシグナルネットワークの分子機構・論理を追求するため、マウスをモデル動物に、主に発生工学的手法を用いてこれにアプローチした。具体的には、カルシウム流入を担う分子の実体である種々のチャネル分子の構造や多様性、発現様式を調べるとともに、それらの遺伝子の欠損動物の作製・解析を行い、各々のチャネルを介するカルシウムの役割や、チャネル間の機能的関係性について調べた。さらに、組織特異的に遺伝子欠損を行う為のマウスの開発（鈴木らによる項を参照）や、カルシウム動態を生体中でより長時間、広範囲に可視化できる遺伝子導入マウスの開発など、カルシウムシグナル系をより部位特異的に、あるいは組織システムのレベルで総合的に捉えるのに必要な系の開発も併せて行った。本稿ではこのうち、遺伝子欠損マウスについてとりあげる。作製したマウスは何れも各々の遺伝子欠損に特徴的な性質を示しているが、ここでは特に3型リアノジン受容体（RyR3）欠損マウスについて、そのユニークな性質を報告する。

2. 背景および目的

細胞質へのカルシウム流入には、細胞外からの経路と、主として小胞体などの細胞内ストアからの経路があるが、リアノジン受容体（RyR）は後者を司るチャネルの一つであり、そのうち3型受容体（RyR3）は空間学習やその記憶等に重要な役割を果たしていると考えられる脳の海馬 CA1 領域に多く発現している。記憶・学習の細胞レベルでの機構を反映すると考えられる現象に長期増強（LTP）や長期抑圧（LTD）があるが、海馬 CA1 領域でのそれらシナプス可塑性の調節においては、細胞外からのカルシウム流入がその誘導に必要であり、カルシウム流入を阻害すると空間学習等が障害されることが知られている（1）。一方、細胞内ストア由来のカルシウムの役割についてはよくわかっていない。そこで、我々は RyR3 欠損マウスを作出し、海馬 CA1 のシナプス可塑性や空間学習能力等を解析して、高次脳機能における RyR3 の役割を調べた。

3. 実験結果

1) RyR3 欠損マウスの作製と確認

RyR3 欠損マウスは常法に従い作製した。Targeting Vector と、抗 RyR 抗体を用いたウエスタンブロットによる RyR3 欠損確認について、**Figure 1** に示す。マウスは正常に生育し、組織学的にも異常はなかった。脳切片のリアノジン結合実験の結果も RyR3 欠損に対応しており、小胞体からのもう一つのカルシウム放出チャネルであるイノシトール 3 リン酸受容体 (IP3R) による代償が起こっていないことも確認した。

2) RyR3 欠損マウスにおける海馬 CA1 のシナプス可塑性

RyR3 欠損マウスの海馬 CA1 の LTP を調べたところ、通常の刺激 (100Hz, 1sec) では野生型 (WT) マウスと差がないものの、WT では LTP が起きないような弱い刺激 (100Hz, 100msec) でも LTP が起きる、即ち LTP の誘導閾値が低下していることがわかった (**Figure 2**)。Basal synaptic transmission や前シナプス性の機構に異常が認められなかったことから、後シナプスの機能変化により LTP が変化したものと考えられた。また、NMDA 受容体等による細胞外からのカルシウム流入を阻害しても LTP が惹起され (**Figure 3**)、このマウスではより少ないカルシウム流入で LTP が誘導されることが示唆される。また、LTD は誘導されなかった (**Figure 4**)。

3) モリス水迷路テストにおける RyR3 欠損マウスの行動・学習

RyR3 欠損マウスの空間学習能力について、モリス水迷路を用いて調べた。Hidden Platform の位置の学習過程は WT マウスとの間に有意な差は認められなかったが、その後 platform を除くと (probe trial test)、もと platform のあった場所付近を泳ぎ回る傾向が認められた (**Figure 5**)。空間記憶そのもの、あるいはそれに行動が拘束される傾向が強くなっているものと思われる。T迷路や八方迷路における行動でも WT マウスとの差が見られた。

4. 考察

RyR3 欠損マウスで海馬 CA1 の LTP 誘導閾値が低下したことより、WT マウスでは RyR3 により細胞質へ放出される細胞内ストアのカルシウムが、細胞外から流入するそれとは対照的に、LTP 誘導を負に調節していることが示唆される。これはシナプス可塑性のホメオスタシスや制御システムの観点からも興味深い。また、RyR3 が LTD 誘導に関わることも示されたが、これらの結果を説明するモデルの一つとして、RyR3 により放出されたカルシウムが calcineurin など、カルシウム依存性の蛋白質脱リン酸化酵素をより選択的に活性化して、大量のカルシウム流入により活性化されると考えられる蛋白質リン酸化酵素の働きと拮抗することなどが考えられる (**Figure 6**)。また、モリス水迷路で見られた行動・学習の変化は海馬シナプス可塑性の変化を反映しているものと考えている。NMDA 受容体の特定サブユニットの強制発現により、同じく海馬 LTP と学習記憶能力を上昇させたマウスが報告されており (2)、これと比較・対照するのも面白い。

5. まとめ

以上の結果は、カルシウムがその由来により弁別的に機能すること、また、細胞内カルシウム放出チャネルの機能を修飾することによって、神経機能や疾患に対して、細胞外からのカルシウム流入に対してとは別の、新しい効果が期待できることを示唆する。その分子機序の解明には更に今後の解析が必要であるが、これはカルシウムを介した細胞内情報伝達システムの仕組みについて、新たな光を投げかけた成果の一つと考えている。この成果を論文発表した(3)。

6. 文献

- 1) J. Z. Tsien et al. Cell 87, 1327-1338 (1996)
- 2) Y-P. Tang et al. Nature 401, 63-69 (1999)
- 3) A. Futatsugi, K. Kato et al. Neuron 24, 701-713 (1999)

RyR3欠損マウスの電気生理学的解析は、当プロジェクトの加藤、および李により行われた。行動解析はエーザイ(株)の小倉博雄博士にお世話になりました。その他、慶應大学の田中耕太郎、永田栄一郎両博士、塩野義製薬(株)の桑島吾郎博士、理研脳センターの糸原重美博士の御協力をいただきました。厚く御礼申し上げます。

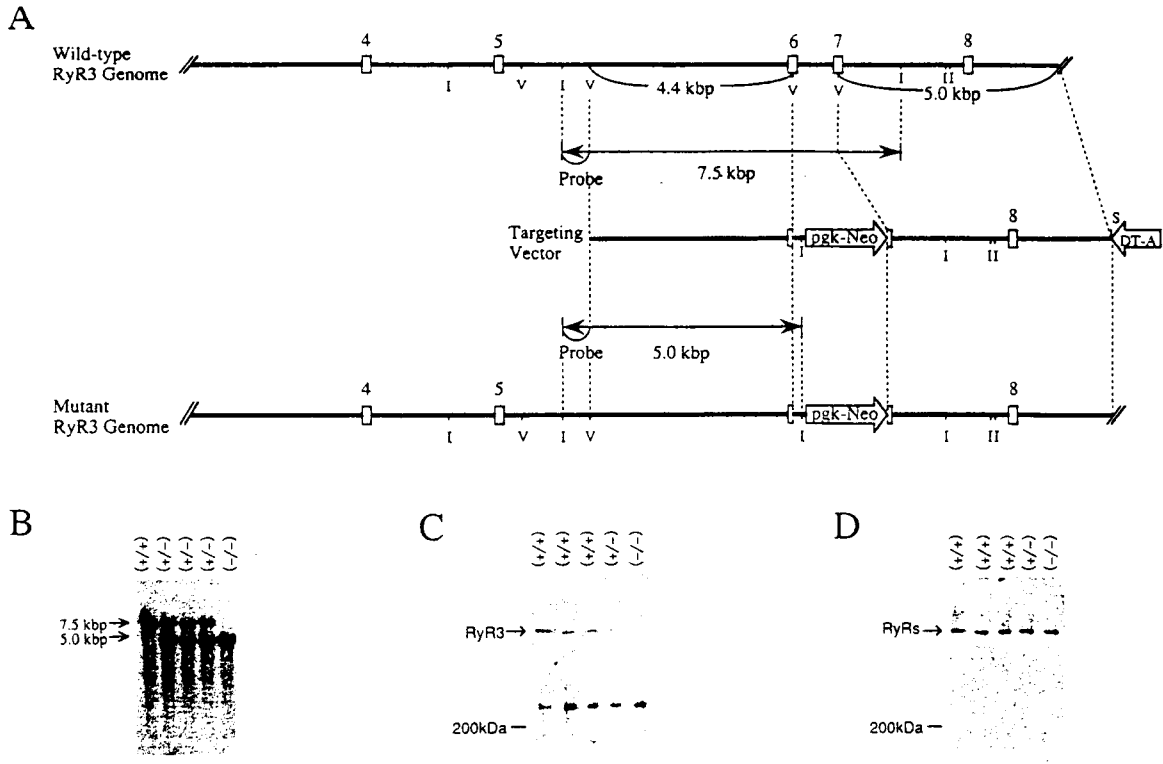


Figure 1. Generation of RyR3-Deficient Mice

- (A) Targeting construct and part of the mouse RyR3 gene. The disrupted region was between the sites corresponding to G145-E215.
 (B) Southern blot analysis of genomic DNA from mouse tail.

- (C) Western blot analysis with RyR3-specific antibody. Microsomal fraction of the cerebrum, including the hippocampus, was probed with anti-B4 antibody, a rabbit polyclonal antibody raised against K2693-Q2712 of RyR3.
 (D) Western blot analysis with an antibody to RyRs. Anti-C2 antibody, that cross-reacts with all RyRs, was used.

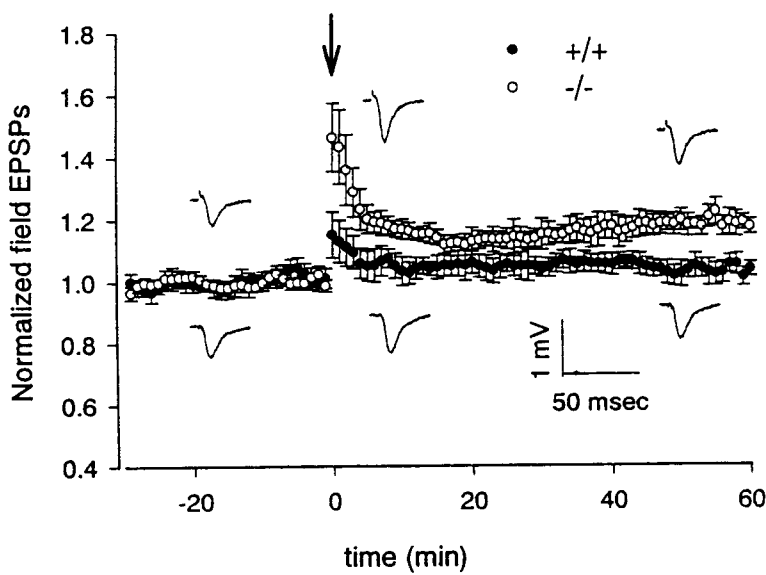


Figure 2. Hippocampal CA1 LTP in Slices from RyR3 (+/+) and RyR3 (-/-) Mice

Amplitude of field EPSPs evoked by short tetanus stimulation (100Hz, 100ms). (+/+, n=9; (-/-), n=10.

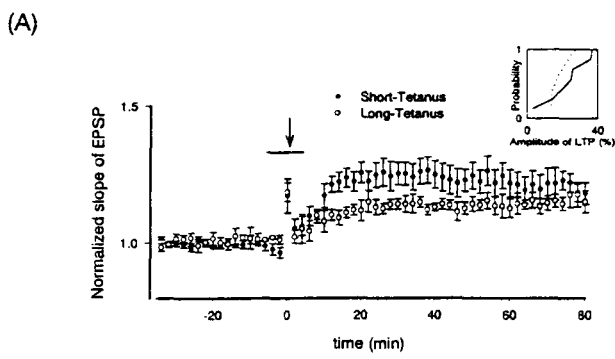


Figure 3. Effects of Blockers for Calcium Channels and Receptors on CA1 LTP in RyR3 (-/-) Mice

- (A) The effects of 50uM D-APV on short tetanus (100Hz, 100msec)-induced LTP and long-tetanus (100Hz, 1sec)-induced LTP in RyR3 (-/-) mice. D-APV is the antagonist of NMDA Receptors.
- (B) Summary of the effects of various blockers on short tetanus-induced LTP in RyR3 (-/-) mice. Nimodipine and Ni block L-type and T-type voltage-dependent calcium channels, respectively. MCPG is the blocker for metabotropic glutamate receptors.

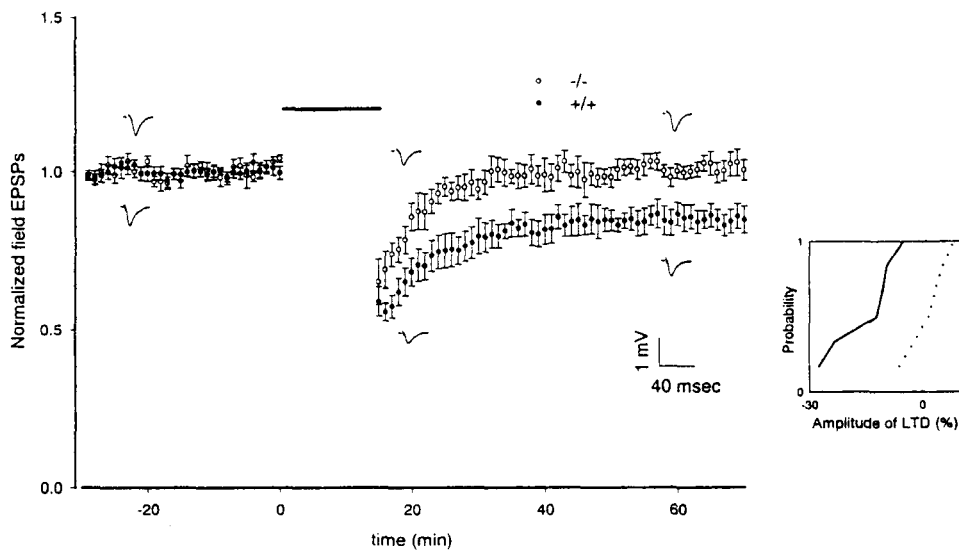
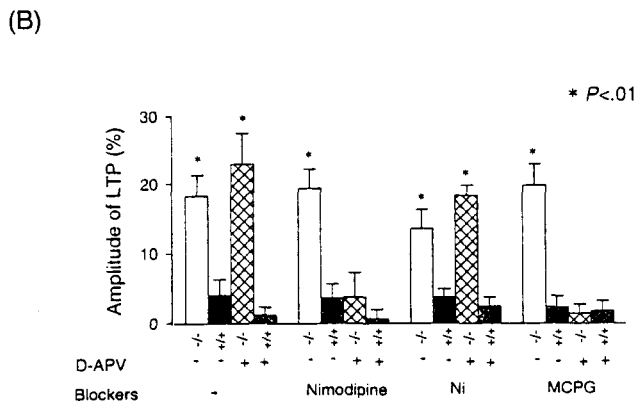


Figure 4. LTD Induction in RyR3 (-/-) Mice

LTD induction using low-frequency stimulation (1Hz, 15min).
n=7 for each genotype.

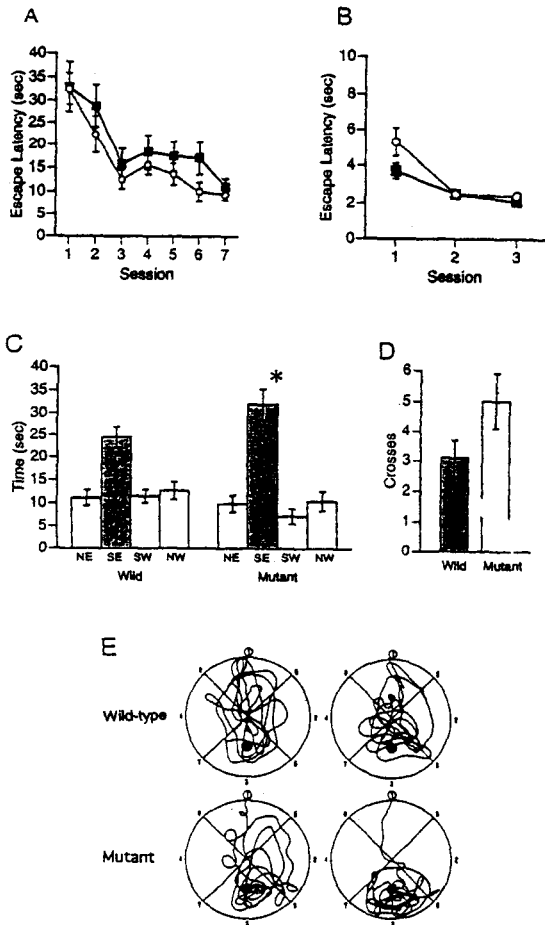


Figure 5. Spatial Learning of RyR3(+/+) and RyR3(-/-) Mice in a Morris Water Maze

RyR3 (+/+) (n=10, solid squares) and RyR3 (-/-) (n=12, open circles) male littermates were used.
 (A) Escape latencies in the hidden-platform task.
 (B) Escape latencies in the cued-platform task.
 (C) Time spent in each quadrant during the probe trial. ANOVA $F[1,20]=5.680$, $p=.0272$.
 (D) The number of times the former platform site was crossed during the probe trial. $F[1,20]=4.204$, $p=.0517$.
 (E) The tracking traces in the probe trial. Two examples from each genotype that exhibit the average number of crosses for each group.

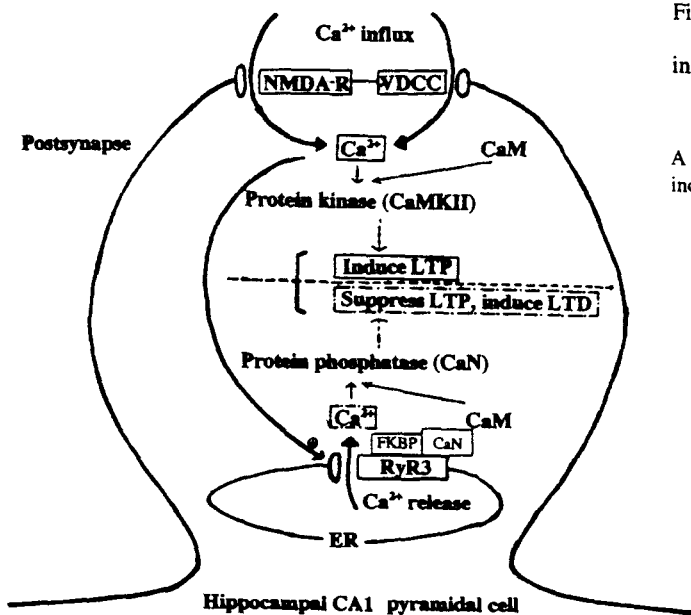


Figure 6. A Model for RyR3 Regulation of LTP and LTD in Hippocampal CA1 Region

A possible mechanism underlying the bifunctional effect of increased intracellular calcium.