

「脳を知る」

平成7年度採択研究代表者

勝木 元也

(東京大学医科学研究所 教授)

「遺伝子変換マウスによる脳機能の解明」

1. 研究実施の概要

脳機能の最も魅力的な研究対象はヒトである。しかし、実験的研究は難しい。とくに遺伝子の変異を用いた分子レベルの実験的解析を、ヒトを対象に行うことは不可能である。

そこで、ヒトの脳機能に關与することが既に知られているドーパミン受容体遺伝子を破壊またはヒト型に変換したマウスを作り、これらのマウスの解析を通してヒトに外挿出来る脳機能モデル(ヒト型マウス)の創造を目的に研究を行った。

また、これまで癌遺伝子として知られているH-rasについても、海馬におけるシナプス可塑性に關与していることを、遺伝子変換マウスの解析によって明らかにした。これは、NMDA受容体のチロシンリン酸化がRasを介したシグナル伝達経路によって制御されていることを示した最初の知見である。

2. 研究実施内容

1) 研究のねらい

本研究の特徴は、脳機能に重要な働きをしていると考えられている神経伝達物質受容体遺伝子を変換したマウスを創り、その個体の表現型を解析することによって、ヒトに外挿できる動物実験システムを確立するところにある。遺伝子変換マウスの、もう一つの特長は、ヒトでは多重に遺伝子を欠損させることは出来ないが、マウスでは交配によってドーパミン受容体遺伝子を多重に欠損させるなど、いくつもの生体分子の相互作用を含む機能を個体において総合的に解析できる。

対象となるドーパミン受容体については、5種類の遺伝子が知られており、D1およびD5が薬理学的分類によりD1様であり、D2、D3、D4が、D2様とされている。このうちヒトD2様受容体には、突然変異や種々の多型が存在し、分裂病との関連が示唆されるものがある。とくにD3のスプライシングの異常や、D4のアミノ酸の繰り返し配列についての報告が多い。一方、マウスなどの実験動物にはこれらの多型は存在しない。以上の知識を踏まえた上で、ドーパミン受容体5種類のノックアウトマウスおよびその多重欠損マウスを作製し、行動薬理

学的解析および分子生物学的解析を行うことは、ヒトの反応をマウスに移し、個体の反応として解析できる点で、きわめて独創的であると考えられる。

また、脳に多く発現しているRasタンパク質の研究から、新たなシナプス可塑性に関わるシグナル伝達機構の存在が示唆された。そこで、分裂病などの異常の研究の基本となる生理的な脳機能である記憶や学習の分子機構の研究においても、遺伝子変換マウスは有効であることが明らかになった。そこで、本研究においてもRasを介するシグナル伝達の脳での機能について解析する。

2) 研究実施方法

脳機能の遺伝的解析には、まず変異体の樹立が前提となる。次に、これらの変異体の行動解析および分子生物学的解析を通して、遺伝子の変換と、脳機能への遺伝子の関与を明らかにする。

さらに、中枢神経細胞のネットワークの形成については、マウスでは細胞の数の多さや発生過程の複雑さから解析が困難である。したがって、ショウジョウバエの解析系を平成10年度から岡崎国立研究機構基礎生物学研究所の勝木研究室（客員部門）に導入した。ここでは、神経ネットワークの形成過程を遺伝子に標識された微小管分子の発生過程を追跡することによって、脳に存在する全神経細胞および全グリア細胞の位置と相互の関係とを決定する。

3) 研究実施状況とこれまでの結果

ドーパミン受容体欠損マウス

本年度までに、マウスドーパミン受容体5種類（D1R、D2R、D3R、D4R、D5R）のノックアウトマウスを作製した。現在の状況は次の通りである。

D1R：ホモ型マウス（-/-）および行動解析

D2R：ホモ型マウス（-/-）および行動解析

D3R：ヘテロ型マウス（+/-）

D4R：ホモ型マウスおよびヒト型多型遺伝子導入トランスジェニックマウス

D5R：ホモ型マウス

多重変異マウス（D1R/D2R、D1R/D5R、D2R/D4R、D2R/D5R）

これらのマウスに関しては、一般的な行動実験（活動性、水迷路、恐怖条件付け、各種の運動調節能試験等）のほか、新たにウテナ式（臺弘先生考案の回廊式行動測定装置）を改良し、複数のマウスの行動の協調性を測定する装置を開発し、情動等の異常に関して検討する。

遺伝子変換マウスについては、それぞれの遺伝子について、表現型を分子生物学的および行動学的に解析した。

D2R欠損マウスは、姿勢が低く、おとなしい。体重がやや軽く（正常の80~90%）、歩行時の体勢も低くこのようである。赤外線を切る回数で測った活動

性は、正常より低い。また、概日周期を活動性で測ると平坦で、はっきりしたリズムが認められない。さらに、明暗箱での出入りのテストでは、暗領域から明に出ることが少なく、正常マウスと明らかに異なっている。

D 4 R 欠損マウスは、運動性が低いと報告されているが、我々のマウスについては、正常マウスとの差が認められない。アルコールに対する感受性、コカインやメタンフェタミンに対する感受性等のテストを行う。

D 2 R と D 4 R の双方を欠損するマウスを交配により作製した。2重欠損マウスは、生存し、生殖能をもつことが確かめられた。行動観察から、きわめておとなしく、運動性も低く、またメタンフェタミンに対しても反応しない。

H-Ras蛋白質によるNMDA受容体活性化の制御

H-ras ノックアウトマウスの研究から、細胞の増殖と分化のシグナル伝達に中心的な役割をしていると考えられているH-Rasが、海馬での長期増強の調節に深く関わっていることを見出した。この発見は、細胞増殖に関与することが明らかな遺伝子が、増殖がないとされる神経細胞の機能にも深く関わっていることを示すものであり、その記憶への関与のメカニズムが興味深い。

最近、いくつかのノックアウトマウスで、LTPの上昇が認められているが、いずれも、NMDA受容体のカルシウムチャネルの活性化を通じたのものではなく、AMPA受容体の修飾による例である。LTPの本質は、NMDA受容体の感受性の上昇にあることから、シナプスの可塑性を直接制御していると考えられる機構にH-Rasが関与しているものと考えられた。

そこで、NMDA受容体の活性化調節の機構を明らかにするため、NMDA受容体のうち、チロシンリン酸化によって活性化していることが知られているNR2A, NR2B のリン酸化を調べたところ、いずれも野生型に比べ1.5倍近くの上昇が認められた。またチャンネル形成に必要なNR1サブユニットを免疫沈降させ、NR2A, NR2B の存在比を調べたところ、正常マウスと、H-ras ノックアウトマウスとの間に差は認められなかった。これは、チャンネルを形成する要素の違いによる活性化の違いではなく、長期増強機構の調節にH-Rasタンパク質とそのシグナル伝達機構が関与していることを示すきわめて重要な発見と思われる。

さらに、最近、Rasの活性を調節するsynGAPやRasGRFなどのタンパク質が、ポストシナプティックデンシティ (PSD) に発見され、また、我々の実験からは、シナプトゾームにH-Rasの存在が確認され、Rasを介したシグナル伝達のシナプス可塑性の制御機構への関与が示唆されている。これらの事実を総合すれば、NMDA受容体のリン酸化による活性化の制御にH-Rasが直接関与しているばかりでなく、発生の過程でH-Rasの欠損がシナプスの構造に何らかの変化を与えている可能性も考えられる。

以上の成果は、当然ほかのRasタンパク質の発現や機能とも関係していると考えられるので、3種類すべてのRas (H-, N-, K-) のすべてについてノックアウトマウスを作製した。さらにそれらの多重欠損マウス、およびNMDA受容体のリン酸化に関与していると考えられているCaMKII, Fyn, Src, PKC などのノックアウトマウスと交配によりH-Rasとの二重欠損マウスを作製した。

以上のノックアウトマウスの解析は、今後電気生理学的、分子生物学的に進める必要がある。表現型からは、H-Rasの下流でCaMKII, Fyn, Src, PKC などのタンパク質が機能していることが予想される。

基礎生物学研究所の勝木グループでは、今年度も引き続き、伊藤啓助手が中心になって、ショウジョウバエの中樞神経細胞の系譜をすべて追跡し、すべての細胞のネットワーク作りを行っている。既にグリア細胞のすべてと神経細胞の約60%を達成し、2年以内に全神経細胞の系譜とネットワークを完成する。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Manabe, T., Aiba, A., Yamada, A., Ichise, T. and Katsuki, M.: Regulation of long-term potentiation by H-Ras through NMDA receptor phosphorylation. *J. Neuroscience*, 20, 2504-2511 (2000)

Sunahara, S., Nakamura, K., Nakao, K., Gondo, Y., Nagata, Y. and Katsuki, M.
The oocyte-specific methylated region of the U2afbp-rs/U2af1-rs1 gene is dispensable for its imprinted methylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268, 590-595 (2000)

Sugiyama, T., Hirono, M., Suzuki, K., Nakamura, Y., Aiba, A., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M. and Yoshioka, T.: Localization of phospholipase C β isozymes in the mouse cerebellum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 265, 473-478 (1999)

Sato, T., Oyake, M., Nakamura, K., Nakao, K., Fukusima, Y., Onodera, O., Igarashi, S., Takano, H., Kikugawa, K., Ishida, Y., Shimohata, T., Koide, R., Ikeuchi, T., Tanaka, H., Futamura, N., Matsumura, R., Takayanagi, T., Tanaka, F., Sobue, G., Komure, O., Takahashi, M., Sano, A., Ichikawa, Y., Goto, J., Kanazawa, I., Katsuki, M. and Tsuji, S.: Transgenic mice harboring a full-length human mutant DRPLA gene exhibit age-dependent intergenerational and somatic instabilities of CAG repeats comparable with those in DRPLA patients. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 99-106 (1999)

Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T. and Yokota, T.: STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells.

EMBO J., 18, 4261-4269 (1999)