

「脳を知る」

平成8年度採択研究代表者

## 三品 昌美

(東京大学大学院医学系研究科 教授)

### 「脳形成遺伝子と脳高次機能」

#### 1. 研究実施の概要

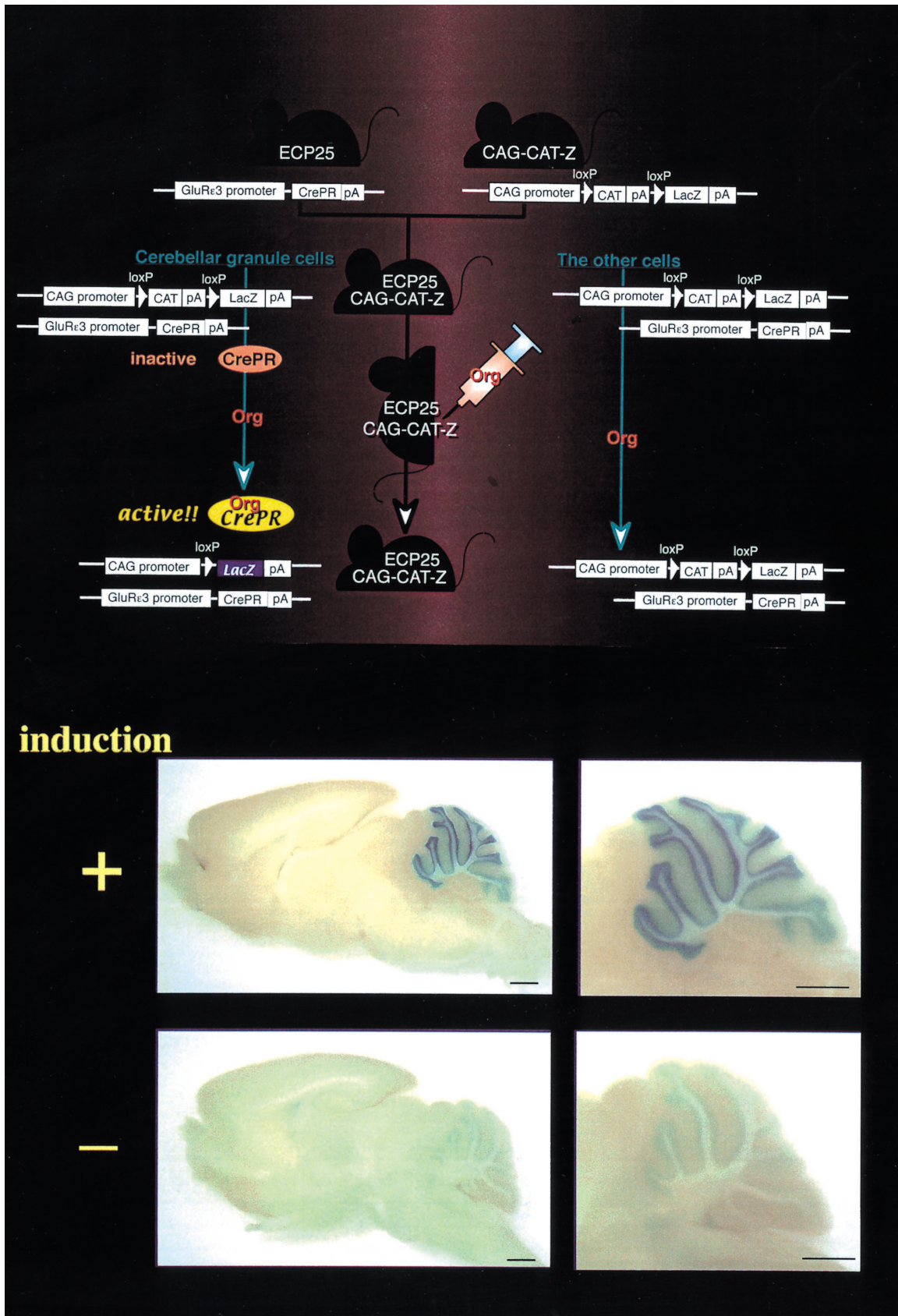
我々は、記憶・学習の分子機構には神経回路網の形成整備機構が適用されているとの仮説に到達した。本研究は、脳の形成および神経回路網整備を担う分子と記憶・学習との関係を明らかにすることによりこの仮説を検証することを目的としている。脳の形成遺伝子探索系として、欠失変異を引き起こすことが知られているDNA架橋剤4,5',8'-トリメチルソラレン(4,5',8-trimethylpsoralen、TMP)でゼブラフィッシュの精子を処理すると高頻度に変異を誘発することを見出した。TMP変異法により単離した変異株の中から、視蓋神経叢の形成不全や感覚神経突起の異常伸長を示す神経系の変異株を選び、RDA(representational difference analysis)法を適用して正常ゲノムと変異ゲノム間でサブトラクションを行い、原因遺伝子を直接単離する方法論の開発を進め、脊椎動物のモデル動物であるゼブラフィッシュの遺伝子クローニングと直結した変異法を確立することを目指している。さらに、脳の形成整備遺伝子が脳の高次機能に果たす役割を解析するために、部位時期特異的遺伝子ノックアウト法の開発を進めている。変異プロゲステロン受容体のホルモン結合領域と遺伝子組換え酵素Creリコンビナーゼの融合蛋白遺伝子をNMDA受容体GluR3遺伝子の5'領域に接続し、C57BL/6系統に導入したトランスジェニックマウスに合成アンチプロゲステロンを投与することにより小脳顆粒細胞特異的にCreリコンビナーゼの活性が誘導されることを見出した。したがって、小脳顆粒細胞特異的にかつ時期特異的に遺伝子をノックアウトすることが可能となった。また、サブタイプ特異的ノックアウトにより、NMDA型グルタミン酸受容体1サブユニットが海馬シナプス可塑性の閾値と文脈依存学習の閾値を決定していることを示し、NMDA受容体2サブユニットが情動を制御していることを見出した。さらに、部位特異的ノックアウトにより、グルタミン酸受容体2サブユニットが小脳可塑性と特定の運動学習に必須であることを示した。

#### 2. 研究実施内容

AMPA型グルタミン酸受容体チャンネルは直接Lynチロシンキナーゼを介して下流にシグナルを伝える：小脳のAMPA型グルタミン酸受容体チャンネルのC末端

側細胞質領域にはLynチロシンキナーゼがSH領域を介して相互作用していることを免疫沈降や融合蛋白との結合実験から見出した。さらに、小脳培養細胞を100 mM AMPAで刺激することにより、Lynチロシンキナーゼのリン酸化が引き起こされ、MAPキナーゼが活性化されることを示した。同時に、これらの刺激はBDNFの遺伝子発現を促進することを見出した。これらの結果は、AMPA型グルタミン酸受容体チャネルはグルタミン酸依存性イオンチャネルとしての機能に加え、強い活性化の条件下では直接Lynチロシンキナーゼを介して下流にシグナルを伝え、BDNF誘導に関わる可能性を示唆した。

Creリコンビナーゼを小脳顆粒細胞特異的かつ時期特異的に発現するマウス系統の確立：任意の時期に遺伝子欠損を引き起こすために、ステロイドホルモン受容体の制御機構を利用した。プロゲステロン受容体のホルモン結合領域の一部を欠失した変異体は、プロゲステロンとは結合しないが、プロゲステロン受容体のアンタゴニストと結合し活性化が起きることが知られていた。この変異プロゲステロン受容体のホルモン結合領域と遺伝子組み換え酵素Creリコンビナーゼとを融合させることにより、Creリコンビナーゼの活性を制御できることを培養細胞を用いて確認した。融合蛋白(CrePR)遺伝子を主として小脳顆粒細胞に発現するNMDA受容体GluR3遺伝子の5'領域に接続した発現ベクターを構築し、C57BL/6系統由来のトランスジェニックマウスを作成した。小脳顆粒細胞特異的にCrePR mRNAを強く発現するECP25系統を得た。このマウスとCreリコンビナーゼ活性依存的に $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現するCAG-CAT-Zトランスジェニックマウスを掛け合わせ、合成アンチプロゲステロンを投与することにより小脳顆粒細胞特異的にCreリコンビナーゼの活性が誘導されることを見出した(図1)。したがって、ECP25マウスを用いて小脳顆粒細胞特異的かつ時期特異的に遺伝子をノックアウトすることが可能となった。



### 3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

T. Hayashi, H. Umemori, M. Mishina and T. Yamamoto; The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. *Nature*, 397, 72-76 (1999)

T. Furuyashiki, K. Fujisawa, A. Fujita, P. Madaule, S. Uchino, M. Mishina, H. Bito and S. Narumiya; Citron, a Rho-target, interacts with PSD-95/SAP-90 at glutamatergic synapses in the thalamus. *J. Neurosci.*, 19, 109-118 (1999)

Minami, T., Okuda-Ashitaka, E., Hori, Y., Sakuma, S., Sugimoto, T., Sakimura, K., Mishina, M. and Ito, S. Involvement of primary afferent C-fibers in touch-evoked pain (allodynia) induced by prostaglandin E2. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 1849-1856 (1999)

Sakata, K., Fukushima, T., Minje, L., Ogurusu, T., Taira, H., Mishina, M. and Shingai, R. Modulation by L- and D-isoforms of amino acids of the L-glutamate response of N-methyl-D-aspartate receptors. *Biochemistry*, 38, 10099-10106 (1999)

Hashimoto, K., Fukaya, M., Qiao, X., Sakimura, K., Watanabe, M. and Kano, M.: Impairment of AMPA receptor function in cerebellar granule cells of ataxic mutant mouse stargazer. *J. Neurosci.*, 19, 6027-6036 (1999).

Tsujita, M., Mori, H., Watanabe, M., Suzuki, M., Miyazaki, J. and Mishina, M. Cerebellar granule cell-specific and inducible expression of Cre recombinase in the mouse. *J. Neurosci.*, 19, 10318-10323 (1999)