

平成22年6月3日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17024038
 研究課題名（和文） 時空間特異的遺伝子発現マウスを用いた脳のシステム制御の解析
 研究課題名（英文） Genetic analysis of central nervous system by using conditional mutant mice
 研究代表者
 饗場 篤 (AIBA ATSU)
 東京大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：20271116

研究成果の概要（和文）：代謝型グルタミン酸受容体1型(mGluR1)を小脳プルキンエ細胞のみで特定の時期に欠損もしくは発現誘導できるマウス系統を樹立し、mGluR1が成体でも運動協調に必要なこと、瞬目反射の古典的条件づけの学習獲得に必要なだが、記憶の維持、発現には必要ないことを明らかにした。また、RhoファミリーGTPase Rac1が軸索の形成や伸長自体には必須ではないが、交連ニューロンの軸索の正中線交差に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We established the mGluR1 cKO mice in which mGluR1 expression can be turned off with doxycycline. Using mGluR1 cKO mice, we showed that mGluR1 is essential for motor coordination in adulthood and that conditioned eyeblink memory was not formed without mGluR1 but once formed memory was maintained and expressed without mGluR1. We also showed that a Rho family GTPase Rac1 specifically controls the midline crossing of the commissural axons during cortical development, rather than neuronal migration and axonal formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	23,000,000	0	23,000,000
2006年度	20,900,000	0	20,900,000
2007年度	19,800,000	0	19,800,000
2008年度	20,600,000	0	20,600,000
2009年度	21,500,000	0	21,500,000
総計	105,800,000	0	105,800,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：mGluR1, Rac, トランスジェニックマウス、ノックアウトマウス、プルキンエ細胞

1. 研究開始当初の背景
 遺伝子発現が薬物の投与等によって自由
- に制御されるマウスを用いた脳研究はこれまで国内外を合わせて本研究開始当時では

数報が報告されているに過ぎなかった。当初その実現には困難が予想されたがこの実験系でしか解けない問題は多く、本研究ではそのようなマウス系統の樹立を試みた。また、ヒトの精神遅滞は樹状突起やスパインの異常との関連が指摘されており、その原因遺伝子には Rho ファミリー GTPase と直接相互作用するエフェクター分子 Pak3、負の制御因子 oligophrenin、正の制御因子 ARHGEF6 といったタンパク質をコードするものが複数知られていた。Rho ファミリー GTPase の中で中枢神経系に強く発現し重要な役割を果たしていると考えられる Rac1 および Cdc42 は、ノックアウトマウスが胎生期致死であったことから個体レベルでの解析は遅れており、それらの神経細胞特異的ノックアウトマウスの解析は神経回路の形成における個々の分子の生理機能を明らかにするだけでなく、精神遅滞の病態の発症機序を知る上でも重要な知見を与える可能性があった。

2. 研究の目的

学習や神経回路形成においては神経伝達物質受容体が介するシナプスの伝達や可塑性が必要だと考えられているが、そのシナプスの伝達や可塑性がどの時期に必要なのか、またシナプス伝達や可塑性に必須な分子の発現する時期を正常動物での発現時期から動かすことにより活動依存的な神経回路形成が発達のどの段階まで起こり得るか、という問題に対しては従来の可塑性分子のコンベンショナルノックアウトマウスの解析からは解答が得られなかった。本研究では、代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) 分子を特定の時期に欠損もしくは発現誘導できるマウスを、ドキシサイクリン投与によって転写活性が抑制できるテトラサイクリン調節トランス活性化因子 (tTA) を用いて作製した。そして、この mGluR1 conditional knockout (cKO) マウスを用いて、神経回路形成後に mGluR1 の発現を停止させた時に、mGluR1 null マウスで観察された小脳失調、登上線維によるプルキンエ細胞の多重支配、運動学習の異常が生じるかどうかを検討し、mGluR1 が神経回路形成後に持つ機能を検討した。また、mGluR1 欠損により異常になる運動協調や運動学習 (瞬目反射の古典的条件づけ) 等について mGluR1 分子もしくは mGluR1 依存的な可塑性がいつ必要となるか検討を

行った。

本研究では、Rho ファミリー GTPase の神経細胞における機能の解析も目的とした。中枢神経系において神経細胞は、他の神経細胞と適切にシナプス形成することによって機能的に成熟する。このような神経ネットワークを形成するために、神経細胞は細胞移動・極性形成・軸索ガイダンス・接着といった細胞骨格系の制御を精密に行う必要がある。Rho ファミリー GTPase は細胞内シグナル伝達の分子スイッチとして機能し、アクチン細胞骨格の制御系の中心に位置することから、中枢神経系における神経回路形成に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、Rho ファミリー GTPase に属する低分子量 G 蛋白質の中で、中枢神経系に強く発現し、中枢神経系で重要な役割を果たしていると考えられる Rac1 および Cdc42 の神経細胞特異的ノックアウトマウスを Cre-loxP システムを用いて作製・解析し、in vivo でのこれらの分子の役割の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) mGluR1 conditional knockout (cKO) マウスの解析

ドキシサイクリン投与によって転写活性が抑制できる制御因子 tTA および tTA が特異的に結合する配列 TRE を用いて mGluR1 分子を生後の特定時期で欠損もしくは発現誘導できるマウスを作製した。具体的には mGluR1 (-/-) マウスに 2 種のトランスジーン L7-tTA および TRE-mGluR1 を導入し、mGluR1 cKO マウスを作製した。mGluR1 の発現は、ウェスタンブロット解析および免疫染色により決定した。mGluR1 cKO マウスを用い、運動協調能をロタロッド試験を用い検討した。また、運動学習の獲得、発現、保持という諸過程のどの過程に mGluR1 が必要とされるのかを調べるため、音を条件刺激、眼瞼への電気ショックを無条件刺激として提示することにより、音を聞いただけで瞬きの条件反射が起こる瞬目反射条件づけ学習を行った。また、プルキンエ細胞への登上線維の投射については、登上線維刺激により誘起されるプルキンエ細胞の EPSC を測定することにより解析した。

(2) mGluR1 結合タンパク質の機能解析

野生型マウスおよび mGluR1KO マウスの小脳のシナプス膜画分より mGluR1 複合体を抗

mGluR1 抗体を用いてアフィニティー精製し LC-MS/MS 分析を行い、mGluR1 と特異的に結合する分子のプロファイリングを行った。また、プルキンエ細胞特異的に mGluR1a または mGluR1b を発現するトランスジェニックマウス (Tg) の小脳を用いて複合体を単離し、MALDI-TOF MS 分析によって構成因子を同定・比較した。さらに、mGluR1a の Homer 結合部位に点変異 (P1147E) を導入した変異 mGluR1a cDNA を L7 プロモーター下に配置したトランスジーン (L7-mGluR1a (P1147E)) を mGluR1 null マウスに導入し、Homer 結合部位変異 mGluR1a のみを発現するレスキューマウスを作製・解析した。

(3) 発現誘導可能なトランスジェニックマウスを用いた mGluR1 経路の解析

ERK/MAP キナーゼの活性化因子である MEK の優性不能型 (dnMEK1) 遺伝子をプルキンエ細胞特異的に発現するマウス (L7-tTA Tg/TRE-dnMEK1 Tg; PC-dnMEK Tg) を作製し、このマウスでの登上線維によるプルキンエ細胞への投射を電気生理学的に検討した。また、悪性黒色腫を発生する二重 Tg (NSE-tTA Tg/TRE-mGluR1a Tg) を作製し、免疫染色やウェスタンブロット解析により、腫瘍の形態や悪性度、腫瘍マーカー等の発現を検討した。さらに、前脳特異的かつ時期特異的に優性不能型 MEK を発現するマウス (CaMKII-tTA Tg/TRE-dnMEK1 Tg; FB-dnMEK Tg) の作製し、海馬 mRNA のマイクロアレイ解析および組織学的解析を行った。

(4) Rho ファミリー GTPase KO マウスの解析

rac1 遺伝子の開始コドンを含むエクソンを loxP 配列で挟んだノックインマウス (floxed Rac1 マウス) および Emx1 プロモーター下に cre 遺伝子をノックインしたマウス (Emx1-Cre マウス) を交配することによって、大脳皮質・海馬・嗅球特異的 Rac1 ノックアウトマウスを作製した。免疫染色実験、順行性および逆行性トレーサーを用いた解剖学的解析を行った。また、floxed Cdc42 マウスとプルキンエ細胞特異的に Cre 酵素を発現する GluRdelta2-Cre マウスと交配することにより作製した小脳プルキンエ細胞特異的 Cdc42 ノックアウトマウスを作製し (PC-Cdc42 KO マウス)、解剖学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) mGluR1 conditional knockout (cKO) マウスの解析

小脳プルキンエ細胞でのシナプス除去、LTD 誘導、運動学習に必須である mGluR1 分子を生後の特定時期で欠損もしくは発現誘導できる mGluR1 cKO マウスでは小脳プルキンエ細胞特異的に mGluR1 が発現し、mGluR1 (-/-) マウスで見られた小脳失調や登上線維によるプルキンエ細胞の多重支配がレスキューされていた。この mGluR1 を時期特異的に発現するマウスを用いて、運動学習の獲得、発現、保持という諸過程のどの過程に mGluR1 が必要とされるのかを調べるため、瞬目反射条件付け学習を行った。一度条件付け学習をさせた cKO マウスにドキシサイクリンを投与して、mGluR1 の発現を停止させ、7 週間後に再学習を行わせると、mGluR1 の発現がなくなっているにもかかわらず、ドキシサイクリンを投与していない cKO マウスと同程度の条件付け反応の割合を示した。一方、ドキシサイクリンを投与して、mGluR1 の発現を停止させたマウスで条件付け学習をさせ、その後投与を停止し、mGluR1 の発現が回復した 7 週間後、再学習をさせた cKO マウスは、実験初日は、mGluR1 が常時発現していない cKO マウスと同程度の反応しか示さなかったが、数日のうちに学習していった。これは、mGluR1 の発現が回復したことにより、学習の獲得が新たに行われていることを示していると考えられる。これら 2 種類の実験結果から、mGluR1 は瞬目反射条件付け学習において、1) 学習の獲得に必要であること、2) 学習の発現には必要ではないこと、が明らかとなった。これらの実験結果は、学習の獲得の場が cKO で mGluR1 の発現している小脳皮質であるという仮説と一致している。

mGluR1 cKO に生後 8 週でドキシサイクリン投与を開始すると 7 週間後には、ウェスタンブロット解析で小脳での mGluR1 発現は認められないが、歩行の障害は mGluR1 を欠損した null マウスに比較して軽度であった。cKO の歩行の障害が null マウスと同等になるには、さらに 10 週間程度の時間が必要であった。mGluR1 の発現が認められない時点で null マウスと同程度の運動失調がみられなかったことから、その後 10 週までに生じた何らかの変化が運動協調に大きな役割を果たしている可能性が示唆された。そこで、mGluR1 が

発現していたプルキンエ細胞に対する登上線維の投射が mGluR1 発現の停止により変化するかどうかを検討した。ドキシサイクリン投与開始後 8 週および 20 週のマウスで登上線維のプルキンエ細胞に対する神経支配のパターンを調べたが、ドキシサイクリン投与群と非投与群で有意の差はなく、8 週齢以降に mGluR1 発現が無くても登上線維の投射に影響を与えないこと、歩行の異常は登上線維の投射パターンの変化以外の原因によることが示唆された。

(2) mGluR1 結合タンパク質の機能解析

mGluR1 の機能を担っている相互作用分子の全貌を理解するため、mGluR1 複合体のプロテオミクス解析を行った。その結果、Homer3, GluRdelta2 といった既知の相互作用分子を含む 125 種類の構成因子を同定できた。さらに、mGluR1 アイソタイプ間の相互作用因子の違いを検討し、mGluR1a 特異的結合因子として、既知の Homer3 に加えて新たに 14-3-3 を同定できた。さらに、mGluR1a と mGluR1a 細胞内 C 末端ドメインと結合する足場タンパク質 Homer の相互作用の小脳機能における重要性を検討した。その結果、mGluR1a の Homer 結合部位に点変異 (P1147E) を導入した変異 mGluR1a (P1147E) は Homer と相互作用しないが、mGluR1a と GluRdelta2 や 14-3-3 との結合能は低下しておらず、mGluR1a とこれらの分子の相互作用は Homer を必要としないことが明らかとなった。さらにこのマウスは mGluR1 null マウスで見られた運動失調をレスキューしていたにも関わらず、プルキンエ細胞-登上線維のシナプス除去に異常が見られた。このことから、mGluR1a-Homer の相互作用は運動協調能には不要であるが、シナプス除去による神経回路の成熟には必要であることが明らかとなった。

(3) 発現誘導可能なトランスジェニックマウスを用いた mGluR1 経路の解析

mGluR1 の下流に存在する ERK/MAP キナーゼ経路の機能を検討するため、MEK の優性不能型 (dnMEK1) 遺伝子をプルキンエ細胞特異的に発現するマウス PC-dnMEK Tg を解析した。組織学的解析から、PC-dnMEK Tg では平行線維終末の分布には明らかな異常は認められなかったが、登上線維終末の大きさや分布に異常が見られ、登上線維によるプルキンエ細

胞の多重支配が認められた。これらの結果から ERK 経路はプルキンエ細胞内で、登上線維終末の形成や維持に関与していることが明らかとなった。

また、我々は、mGluR1 のメラノサイトでの異所的発現によって全ての個体で悪性黒色腫を発生する二重 Tg (NSE-tTA Tg/TRE-mGluR1a Tg) を作製した。この二重 Tg で発生した悪性黒色腫はドキシサイクリン投与により mGluR1 発現を停止すると成長が著しく抑制され、mGluR1 依存的に発生する悪性黒色腫がその成長にも mGluR1 活性を必要とすることが明らかとなった。

海馬歯状回でのニューロン新生に ERK/MAP キナーゼ経路がどのように関与しているかを検討するために、前脳特異的かつ時期特異的に優性不能型 MEK を発現するマウス FB-dnMEK Tg を作製し、FB-dnMEK Tg では、dnMEK が大脳皮質、海馬、嗅球等で強く発現しているが、海馬歯状回で発現している遺伝子群の mRNA 量が特異的に減少していることが明らかとなった。さらに、FB-dnMEK Tg では海馬歯状回で顆粒細胞数が減少していることが明らかとなり、ERK 経路が海馬歯状回顆粒細胞の発生、生存等に関与していることが示唆された。

(4) Rho ファミリー GTPase KO マウスの解析

大脳皮質・海馬・嗅球特異的 Rac1 ノックアウトマウスの脳切片を光顕観察したところ、大脳皮質は 6 層の層構造を形成していたものの、移動障害と思われる細胞塊によって層構造が部分的に乱れていた。また、暗視野観察によって脳梁および前交連の白質が著しく減少していたため、逆行性トレーサーを用いて成体マウスの大脳皮質の神経回路を詳細に調べた。その結果、ノックアウトマウスにおいて、大脳皮質から脊髄および視床への投射には、野生型マウスと比較して大きな異常は観察されなかった一方、反対側の大脳皮質への投射が著しく欠損していた。このことから、Rac1 は大脳皮質の交連線維の形成に重要であることが考えられた。さらに、大脳皮質の発生期における軸索の走行を DiI によって順行標識した。その結果、ノックアウトマウスの交連ニューロンは、正中線付近まで軸索を伸ばすものの、反対側へ越えることができなかった。これらの結果より、大脳皮質において Rac1 は、軸索の形成や伸長自体に

は必須ではないが、交連ニューロンの軸索の正中線交差に特異的に機能していることを明らかにすることができた。

また、小脳プルキンエ細胞特異的 Cdc42 ノックアウトマウス (PC-Cdc42 KO マウス)は、コントロールマウスと比較して、小脳およびプルキンエ細胞の樹状突起の形態に大きな異常は認められなかったが、軸索起始部にトルピード様の膨らみが観察された。トルピードは軸索輸送が障害された時に観察される構造であることから、Cdc42 はプルキンエ細胞軸索内の輸送系に重要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Matsuda, I., Fukaya, M., Nakao, H., Nakao, K., Matsumoto, H., Mori, K., Watanabe, M. & Aiba, A. Development of the somatosensory cortex, the cerebellum, and the main olfactory system in semaphorin 3F knockout mice. *Neurosci. Res.* 査読有, 66, 321-329 (2010).
- ② Inoue, N., Nakao, H., Migishima, R., Hino, T., Matsui, M., Hayashi, F., Nakao, K., Manabe, T., Aiba, A. & Inokuchi, K. Requirement of the immediate early gene vesl-1S/homer-1a for fear memory formation. *Mol. Brain*, 査読有, 2, 7 (2009).
- ③ Matsumoto, H., Kashiwadani, H., Nagao, H., Aiba, A. & Mori, K. Odor-induced persistent discharge of mitral cells in mouse olfactory bulb. *J. Neurophysiol.* 査読有, 101, 1890-1900 (2009).
- ④ Ohtani, Y., Harada, T., Funasaka, Y., Nakao, K., Takahara, C., Abdel-Daim, M., Sakai, N., Saito, N., Nishigori, C. & Aiba, A. Metabotropic glutamate receptor subtype-1 is essential for *in vivo* growth of melanoma. *Oncogene*, 査読有, 27, 7162-7170 (2008).
- ⑤ Kassai, H., Terashima, T., Fukaya, M., Nakao, K., Sakahara, M., Watanabe, M. & Aiba, A. Rac1 in cortical projection neurons is selectively required for midline crossing of commissural axonal formation. *Eur. J. Neurosci.*, 査読有, 28, 257-267 (2008).
- ⑥ Ito, K., Kawasaki, T., Takashima, S., Matsuda, I., Aiba, A. & Hirata, T. Semaphorin 3F confines ventral tangential migration of lateral olfactory tract neurons onto the telencephalon surface. *J. Neurosci.*, 査読有, 28, 4414-4422 (2008).
- ⑦ Tabata, T., Kawakami, D., Hashimoto, K., Kassai, H., Yoshida, T., Hashimotodani, Y., Fredholm, B., B., Seikno, Y., Aiba, A. & Kano, M. G protein-independent neuromodulatory action of adenosine on metabotropic glutamate signaling in mouse cerebellar Purkinje Cells. *J. Physiol.*, 査読有, 581, 693-708 (2007).
- ⑧ Aiba, A. & Nakao, H. Conditional mutant mice using tetracycline-controlled gene expression system in the brain., *Neurosci Res*, 査読有, 58, 113-117(2007).
- ⑨ Aiba, A., Inokuchi, K., Ishida, Y., Itohara, S., Kobayashi, K., Masu, M., Mishina, M., Miyakawa, T., Mori, H., Nakao, K., Obata, Y., Sakimura, K., Shiroishi, T., Wada, K. & Yagi, T. Mouse liaison for integrative brain research. *Neurosci Res*, 査読有, 58, 103-104, (2007).
- ⑩ Nakao, H., Nakao, K., Kano, M. & Aiba, A. Metabotropic glutamate receptor subtype-1 is essential for motor coordination in the adult cerebellum. *Neurosci. Res.*, 査読有, 57, 538-543 (2007).
- ⑪ Kassai, H., Aiba, A., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Xiong, WH., Yau, KW., Imai, H., Shichida, Y., Satomi, Y., Takao, T., Okano, T. & Fukada, Y. Farnesylation of retinal transducin underlies its translocation during light adaptation. *Neuron*, 査読有, 47, 529-539 (2005).
- ⑫ Maejima, T., Oka, S., Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Aiba, A., Wu, D., Waku, K., Sugiura, T. & Kano, M. Synaptically

driven endocannabinoid release requires Ca^{2+} -assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase Cbeta4 signaling cascade in the cerebellum. *J. Neurosci.*, 査読有, 25, 6826-6835 (2005).

[学会発表] (計 11 件)

- ①中尾晴美, 岸本泰司, 橋本浩一, 中尾和貴, 狩野方伸, 桐野豊, 饗場篤 mGluR1 は瞬目反射条件付け記憶の獲得に必要であり、その発現や保持には必要でない 第 32 回 日本神経科学大会, 2009 年 9 月 17 日, 名古屋
- ②原田 武志, 大谷 善昭, 船坂 陽子, 中尾和貴, 高原 千明, M Abdel-Daim, 酒井 規雄, 齋藤 尚亮, 錦織 千佳子, 饗場 篤 mGluR1 は悪性黒色腫の増殖に必要である 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008 年 12 月 9 日, 神戸
- ③Hidetoshi Kassai, Toshio Terashima, Masahiro Fukaya, Kazuki Nakao, Mizuho Sakahara, Masahiko Watanabe, Atsu Aiba. Small G protein Rac1 is selectively required for the formation of commissural axons in the cerebral cortex, 38th annual meeting of the Society for Neuroscience, 2008. 11. 15-19, Washington DC, USA.
- ④原田 武志, 平井 良枝, 山崎美和子, 橋本 浩一, 中尾 晴美, 田端 俊英, 中尾和貴, 渡辺 雅彦, 狩野 方伸, 饗場 篤 ERK は発達期小脳におけるシナプスの除去に必要である 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 10 日, 東京
- ⑤Aiba, A., Nakao, H., Nakao, K., & Kano, M. mGluR1 is essential for motor coordination in the adult cerebellum., 37th Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2007. 11. 3-7, San Diego, USA.
- ⑥饗場篤 mGluR1 シグナルの遺伝学的解析及びプロテオミクス解析, 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会 合同大会 2007 年 9 月 12 日, 横浜
- ⑦原田武志, 城山優治, 中尾和貴, 真鍋俊也, 饗場篤 ERK は恐怖記憶の形成に必要

である 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会 合同大会, 2007 年 9 月 10 日, 横浜

- ⑧葛西秀俊, 早野俊哉, 高橋信弘, 饗場篤 mGluR1 の複合体分析による小脳機能の解析 日本ヒトプロテオーム機構 第 5 回大会, 2007 年 7 月 30 日-31 日, 東京
- ⑨ Ikuo Matsuda, Nobuyuki Yamasaki, Sei-ichi Hirota, Tsuyoshi Miyakawa, Atsu Aiba. A comprehensive behavioral test battery reveals novel physiological roles of Semaphorin 3F in postnatal brain functions. 第 20 回国際生化学・分子生物学会議/第 11 回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議, 第 79 回日本生化学会大会, 第 29 回日本分子生物学会年会, 2006 年 6 月 20 日, 京都
- ⑩ Yoshiaki Ohtani, Kouichi Hashimoto, Hidetoshi Tabata, Yasushi Kishimoto, Masahiro Fukaya, Kazuki Nakao, Hidetoshi Kassai, Masahiko Watanabe, Masanobu Kano and Atsu Aiba. C-terminal domain of mGluR1a is essential for synapse elimination and eye-blink conditioning., 第 28 回日本神経科学会大会, 2005 年 7 月 26 日-28 日, 横浜
- ⑪饗場篤 代謝型グルタミン酸受容体と高次脳機能, 第 28 回日本神経科学会大会, 2005 年 7 月 26 日-28 日, 横浜

[その他]

研究室ホームページ

<http://lar.cdbim.m.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

饗場 篤 (AIBA ATSU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 20271116

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし