



Metabotropic glutamate receptor subtype-1 is essential for motorcoordination in the adult cerebellum

中尾, 晴美

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3822

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003822>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 2 3 】

| | |
|------------|------------------|
| 氏 名・（本 籍） | 中尾 晴美 （ 兵庫県 ） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（医学） |
| 学 位 記 番 号 | 博い第1821号 |
| 学位授与の 要 件 | 学位規則第 5 条第 1 項該当 |
| 学位授与の 日 付 | 平成19年3月25日 |

【 学位論文題目 】

Metabotropic glutamate receptor subtype-1 is essential for motor
coordination in the adult cerebellum
(代謝型グルタミン酸受容体 1 型は成体の小脳運動協調能に
必須である)

審 査 委 員

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 主 査 | 教 授 | 寺 島 | 俊 雄 |
| | 教 授 | 片 岡 | 徹 |
| | 教 授 | 南 | 康 博 |

グルタミン酸は中枢神経系における主要な興奮性伝達物質で、その受容体の一つである代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) は、脳の様々な部位に発現している。特に小脳のプルキンエ細胞で多く発現しており、この mGluR1 を欠損したマウス(mGluR1 KO マウス)は、小脳運動失調、小脳プルキンエ細胞・平行線維間の長期抑圧(LTD)の欠損、プルキンエ細胞・登上線維間のシナプス除去の異常といった表現型を示す。さらにこれら三つの表現型は、プルキンエ細胞特異的に mGluR1 を発現するマウス (mGluR1-rescue マウス) で、すべて正常にもどることも明らかとなった。そこで本研究では、小脳プルキンエ細胞特異的に mGluR1 を発現させ、尚かつその発現を制御できるような時期特異的 mGluR1 発現マウスを作製し、成体での mGluR1 の機能について解析した。

時期特異的 mGluR1 発現マウス作製のため、ドキシサイクリン投与によって遺伝子発現を制御できる Tet off システムを導入した。まず、小脳プルキンエ細胞特異的な L7 プロモーターの下流に、テトラサイクリン調節トランス活性化因子(tTA)をもつトランスジーンと、tTA が特異的に結合するテトラサイクリン応答因子(TRE)の下流に mGluR1 をもつトランスジーンを、それぞれ mGluR1(+/-)の受精卵にマイクロインジェクションすることによって、mGluR1(+/-)/L7-tTA マウスと mGluR1(+/-)/TRE-mGluR1a マウスを得た。次に、これらの交配により、内在性の mGluR1 が欠損していて、L7-tTA と TRE-mGluR1a のトランスジーンの両方を持つマウス[mGluR1(-/-)/L7-tTA/TRE-mGluR1a: 以下 mGluR1 cKO マウスと呼ぶ]を得た。mGluR1 cKO マウスでは、ドキシサイクリン非投与下で、プルキンエ細胞で tTA が発現し TRE に結合してその下流の mGluR1 が発現する。一方ドキシサイクリン投与下では tTA が不活化して TRE に結合できなくなり、mGluR1 の発現が抑制される。内在性の mGluR1 遺伝子は破壊されているため、このマウスでの mGluR1 の発現は、これら二つのトランスジーンに依存している。この mGluR1 cKO マウスを用いて、ドキシサイクリン投与により、成体で mGluR1 の発現をなくし、運動協調能について解析した。

mGluR1 KO マウスは小脳運動失調を示すが、今回得られた mGluR1 cKO マウスはそれを示さず、mGluR1 KO マウスと容易に区別することができた。また、免疫染色の結果、mGluR1 cKO マウスの脳で、小脳プルキンエ細胞特異的に mGluR1 が発現していることも確認できた。

次にドキシサイクリン投与により、mGluR1 の発現が制御できるかどうかを、免疫染色とウェスタンブロットで確認した。その結果、ドキシサイクリン

ン投与後、mGluR1 の発現は免疫染色でもウェスタンブロットでも検出されず、ドキシサイクリンにより mGluR1 の発現が停止することがわかった。

そこで、成体で mGluR1 を欠損させたときに、運動協調能にどのような影響がもたらされるかを調べるために、生後 24 日(P24)からドキシサイクリンを投与し、mGluR1 の発現を抑制したマウスを用いて、フットプリントとローターロッド試験を実施した。ドキシサイクリン投与後のマウスは運動協調能に異常をきたし、特にローターロッド試験では、非投与のマウスに比べ、回転しているロッドの上に乗っている時間が著しく減少していた。一方、野生型のマウスにドキシサイクリンを投与し、同じようにローターロッド試験を行ったところ、投与群と非投与群との間に有意差がなかったことから、ドキシサイクリンの投与そのものが運動協調能に影響していないことも確認できた。

本研究では、小脳の神経回路形成が終了しているといわれる生後 3 週以降の P24 からドキシサイクリンの投与を開始しており、上述の実験結果から、mGluR1 は発生期の神経回路形成に必要なだけではなく、成体での運動協調能にも重要な役割を果たしていると考えられる。この結果は、ホジキン病患者由来の mGluR1 に対する自己抗体を、マウスの頭部に注射すると、小脳運動失調を引き起こすという Sillevs Smitt 等の報告と一致している。また、mGluR1 に対する自己抗体が産生されているホジキン病の患者の小脳では、プルキンエ細胞の数が減少し、その形状にも異常がみられるという報告もある。ところが、mGluR1 KO マウスやドキシサイクリン投与後の mGluR1 cKO マウスでは、そのような異常はみられない。この相違の原因として、プルキンエ細胞の数の減少や、形状の異常には、mGluR1 の欠損以外の事象が関与している可能性と、成体での長期の mGluR1 の欠損によって、そのような異常が引き起こされる可能性が考えられる。このことを明らかにするには、mGluR1 cKO マウスに 2 年、3 年というドキシサイクリン投与を行い、長期間 mGluR1 を欠損したマウスの小脳を組織学的に解析する必要がある。

最後に、時期特異的に mGluR1 を発現させることのできるマウスを用いることにより、mGluR1 が成体においても必要であることが、遺伝子レベルでも証明できた。さらに、このマウスを用いることで、従来のノックアウトや領域特異的なコンディショナルノックアウトでは知り得なかった、mGluR1 の成体での様々な機能について解析することが可能となった。今後 mGluR1 cKO マウスの小脳において、正常なシナプス除去や LTD が起こっているかを確認したうえで、様々な時期にドキシサイクリンを投与し、mGluR1 を欠

損させると、シナプス形成や LTD にどのような影響が見られるのか、また、母マウスを通した胎生期からのドキシサイクリンの投与により、発生の早い時期から mGluR1 を欠損させて、そのマウスの成体期に mGluR1 の発現を戻すと、mGluR1 KO マウスの表現型である小脳運動失調、LTD の欠損、及びシナプス除去の異常が、正常に戻るか否かについて解析する予定である。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|-------------------------------------|---|-----|-------|
| 受 付 番 号 | 甲 第 1836 号 | 氏 名 | 中尾 晴美 |
| 論 文 題 目 Title of Dissertation | Metabotropic glutamate receptor subtype-1 is essential for motor coordination in the adult cerebellum 代謝型グルタミン酸受容体 1 型は成体の小脳運動協調能に必須で ある | | |
| 審 査 委 員 Examiner | 主 査 寺 島 俊 雄 Chief Examiner 副 査 片 岡 徹 Vice-examiner 副 査 南 康 博 Vice-examiner | | |
| 審査終了日 | 平成 19 年 2 月 21 日 | | |

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

グルタミン酸は中枢神経系における主要な興奮性伝達物質で、その受容体の一つである代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) は、脳の様々な部位に発現している。特に小脳のプルキンエ細胞で多く発現しており、この mGluR1 を欠損したマウス(mGluR1 KO マウス)は、小脳運動失調、小脳プルキンエ細胞-平行線維間の長期抑圧(LTD)の欠損、プルキンエ細胞-登上線維間のシナプス除去の異常といった表現型を示す。さらにこれら三つの表現型は、プルキンエ細胞特異的に mGluR1 を発現するマウス (mGluR1-rescue マウス) で、すべて正常にもどることも明らかとなった。そこで本研究では、小脳プルキンエ細胞特異的に mGluR1 を発現させ、尚かつその発現を制御できるような時期特異的 mGluR1 発現マウスを作製し、成体での mGluR1 の機能について解析した。

時期特異的 mGluR1 発現マウス作製のため、ドキシサイクリン投与によって遺伝子発現を制御できる Tet off システムを導入した。まず、小脳プルキンエ細胞特異的な L7 プロモーターの下流に、テトラサイクリン調節トランス活性化因子(tTA)をもつトランスジーンと、tTA が特異的に結合するテトラサイクリン応答因子(TRE)の下流に mGluR1 をもつトランスジーンを、それぞれ mGluR1(+/-)の受精卵にマイクロインジェクションすることによって、mGluR1(+/-) / L7-tTA マウスと mGluR1(+/-) / TRE-mGluR1a マウスを得た。次に、これらの交配により、内在性の mGluR1 が欠損していて、L7-tTA と TRE-mGluR1a のトランスジーンの両方を持つマウス[mGluR1(-/-) / L7-tTA / TRE-mGluR1a : 以下 mGluR1 cKO マウスと呼ぶ]を得た。mGluR1 cKO マウスでは、ドキシサイクリン非投与下で、プルキンエ細胞で tTA が発現し TRE に結合してその下流の mGluR1 が発現する。一方ドキシサイクリン投与下では tTA が不活化して TRE に結合できなくなり、mGluR1 の発現が抑制される。内在性の mGluR1 遺伝子は破壊されているため、このマウスでの mGluR1 の発現は、これら二つのトランスジーンに依存している。この mGluR1 cKO マウスを用いて、ドキシサイクリン投与により、成体で mGluR1 の発現をなくし、運動協調能について解析した。

mGluR1 KO マウスは小脳運動失調を示すが、今回得られた mGluR1 cKO マウスはそれを示さず、mGluR1 KO マウスと容易に区別することができた。また、免疫染色の結果、mGluR1 cKO マウスの脳で、小脳プルキンエ細胞特異的に mGluR1 が発現していることも確認できた。

次にドキシサイクリン投与により、mGluR1 の発現が制御できるかどうかを、免疫染色とウェスタンブロットで確認した。その結果、ドキシサイクリン投与後、mGluR1 の発現は免疫染色でもウェスタンブロットでも検出されず、ドキシサイクリンにより mGluR1 の発現が停止することがわかった。

そこで、成体で mGluR1 を欠損させたときに、運動協調能にどのような影響がもたらされるかを調べるために、生後 24 日(P24)からドキシサイクリンを投与し、mGluR1 の発現を抑制したマウスを用いて、フットプリントとローターロッド試験を実施した。ドキシサイクリン投与後のマウスは運動協調

能に異常をきたし、特にローターロッド試験では、非投与のマウスに比べ、回転しているロッドの上に乗っている時間が著しく減少していた。一方、野生型のマウスにドキシサイクリンを投与し、同じようにローターロッド試験を行ったところ、投与群と非投与群との間に有意差がなかったことから、ドキシサイクリンの投与そのものが運動協調能に影響していないことも確認できた。本研究では、小脳の神経回路形成がほぼ終了している P24 からドキシサイクリンの投与を開始しており、mGluR1 は発生期の神経回路形成に必要なだけではなく、成体での運動協調能にも重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究は、代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 について、その機能を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった mGluR1 の成体での機能について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。