

モデル動物の開発と脳研究
中西重忠 大阪バイオサイエンス研究所

脳神経系は多数の神経細胞が機能的な神経ネットワーク（神経回路）を形成し、この神経回路の中で情報が処理、統合、保持、抽出されることによって脳機能が発現される。近年多くの脳機能分子の実体が明らかにされたが、脳機能発現にかかわる情報伝達の制御というソフトの問題はなお多くが不明である。小脳神経回路は運動の制御及び運動記憶に必須の役割を果たしている。また小脳神経回路の構成はよく解析されており、神経情報の入力と出力の関係も定量的に解析出来る系である(1)。従って我々は小脳神経回路を研究対象に分子生物学の手法を組み合わせた新しいモデル動物を開発し神経回路の基本的な情報伝達と制御機構の解析を進めてきた。本会ではモデル動物の開発の重要性を議論し、運動記憶と運動制御にかかわる小脳神経回路の新しい制御機構に関する我々の研究成果を紹介する。

可逆的神経伝達阻止法(RNB法)による小脳記憶の解析

条件付瞬目反射は小脳によって支配される代表的な運動記憶である。条件刺激は苔状線維と顆粒細胞によって、一方無条件刺激は下オリーブ核と登上線維によって伝達される

(図1)。苔状線維と登上線維はプルキンエ細胞及び小脳中位核の両者に投射するために(図1)、プルキンエ細胞か或は小脳中位核のどちらが瞬目反射を始めとする小脳記憶を支配しているのかなお論争のある所である。我々は神経伝達物質の分泌を阻止する破傷風毒素をテトラサイクリン依存的、かつ細胞特異的に発現する事によってグルタミン酸神経伝達を可逆的に阻止出来る新たな方法、可逆的神経伝達阻止法(RNB法)を開発した(2)(図2)。この手法を用いて我々は顆粒細胞

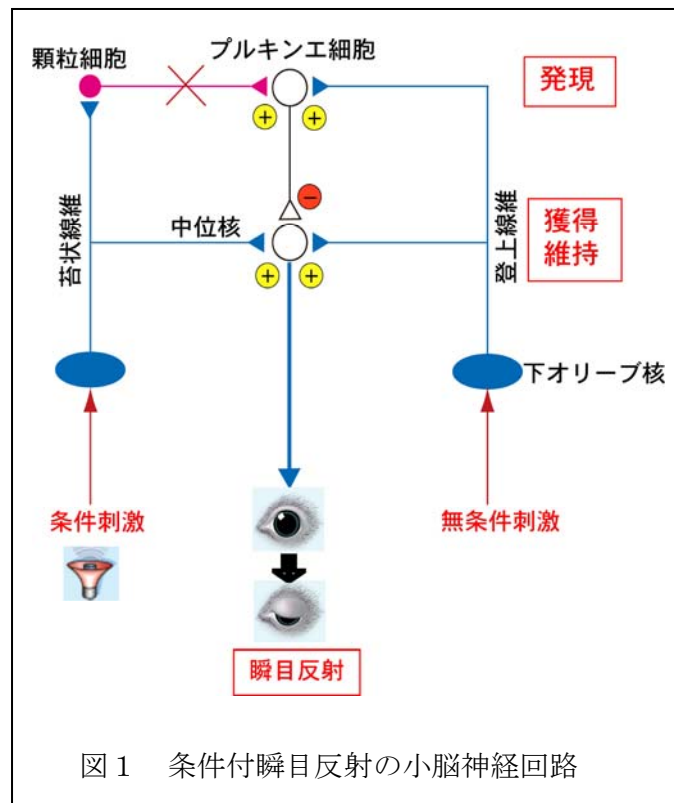
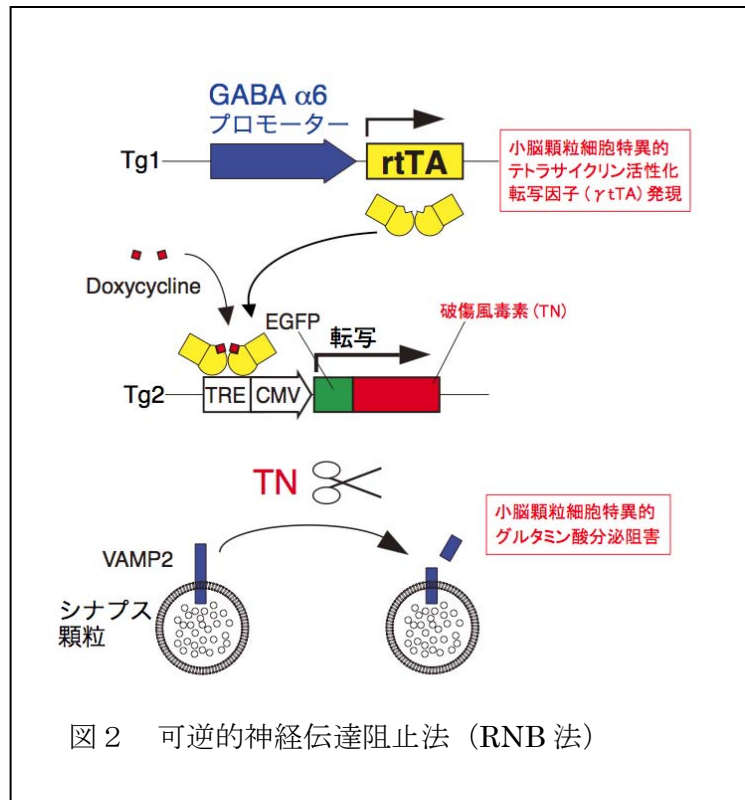


図1 条件付瞬目反射の小脳神経回路

からプルキンエ細胞へのグルタミン酸神経伝達を可逆的にかつ完全に遮断出来るモデ

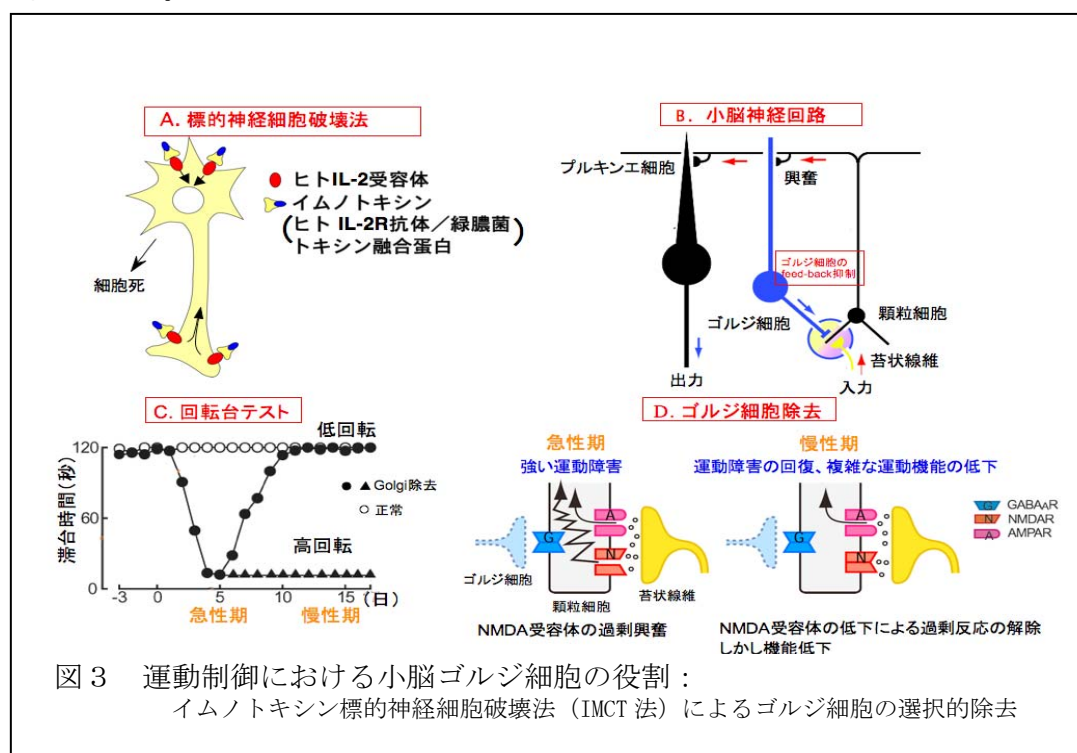
ルマウスを作製する事に成功し、本モデルマウスを用いて条件付瞬目反射の記憶の獲得、発現、維持機構を時系列を持って解析出来る系を確立した。この結果、記憶の獲得、発現、維持に関わる神経回路が分離出来る事、またプルキンエ細胞は発現に、一方小脳中位核は獲得と維持に必須の役割を果たしているという全く新しい事実を明らかにした(3) (図 1)。この結果は神経伝達系において個々の神経回路がそれぞれ独自の神経可塑性を示しその統合によって脳機能が発揮されることを示すものである。



イムノトキシン標的神経細胞破壊法 (IMCT 法) による小脳運動制御機構の解析

小脳皮質の神経回路は顆粒細胞からプルキンエ細胞への神経伝達に加え、ゴルジ細胞が顆粒細胞からの入力を受け、抑制性 GABA によって feed-back 抑制を示す (図 3B)。この feed-back 抑制の生理的意義あるいは制御機構は全く不明であった。我々は神経回路の中から特定の神経細胞を *in vivo* で除去する方法、イムノトキシン標的神経細胞破壊法 (IMCT 法) を開発した(4) (図 3A)。本方法においては、ヒト IL-2 受容体を特定の神経細胞に発現するトランスジェニック・マウスを作製し、ヒト IL-2 受容体のモノクローナル抗体に細菌毒素を融合したイムノトキシンを脳内に注入する。イムノトキシンは apoptosis を起こし他の細胞に障害を与える事無く特定の神経細胞のみを除去する (図 3A)。我々は小脳神経回路の中でヒト IL-2 受容体をゴルジ細胞に特異的に発現するトランスジェニック・マウスを作製し、イムノトキシンを注入して小脳神経回路からゴルジ細胞のみを除去したマウスを作製することに成功した。ゴルジ細胞除去マウスは、ゴルジ細胞を除去した直後の急性期には強い運動障害を示し、例えば低回転の回転台にとどまることが出来ない。一方慢性期になると強い運動障害は消失する。しかし高回転の回転台にはとどまる事が出来ず、複雑な運動機能の障害が残る (図 3C)。

我々は電気生理学、光学的測定法等を駆使して、ゴルジ細胞の伝達制御機構の解析を進め、以下に述べる伝達制御の新しいメカニズムを明らかにした(4, 5) (図 3D)。即ち正常マウスにおいてはゴルジ細胞からの抑制性 GABA が顆粒細胞の NMDA 受容体を制御することによって複雑な運動を可能にする。一方ゴルジ細胞を除去すると GABA の抑制が消失し、NMDA 受容体が過剰に反応し強い運動障害を示す。しかし慢性期になると NMDA 受容体が適応的に低下し、強い運動障害は消失する。一方この低下は複雑な運動機能の障害をもたらす。さらに AMPA 受容体はゴルジ細胞除去とは関係なく活性が維持され、この AMPA 受容体が単純な運動を可能にしている。以上の結果は、神経回路において特定の介在神経細胞が作用することによってグルタミン酸と抑制性の GABA が協調的に働き、この結果、運動制御、情報の処理、統合がなされていること、また急性期の脳機能障害が慢性期に部分的に回復するのは神経伝達の可塑的变化によって起こることを示すものである。



文献

1. Nakanishi, S. (2005) Synaptic mechanisms of the cerebellar cortical network. Trends Neurosci. 28:93-100.
2. Yamamoto, M., Wada, N., Kitabatake, Y., Watanabe, D., Anzai, M., Yokoyama, M., Teranishi, Y. & Nakanishi, S. (2003) Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin

light chain. J.Neurosci. 23:6759-6767.

3. Wada, N., Kishimoto, Y., Watanabe, D., Kano, M., Hirano, T., Funabiki, K. & Nakanishi, S. (2007) Conditioned eyeblink learning is formed and stored without cerebellar granule cell transmission. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 104:16690-16695.
4. Watanabe, D., Inokawa, H., Hashimoto, K., Suzuki, N., Kano, M., Shigemoto, R., Hirano, T., Toyama, K., Kaneko, S., Yokoi, M., Moriyoshi, K., Suzuki, M., Kobayashi, K., Nagatsu, T., Kreitman, R.J., Pastan, I. & Nakanishi, S. (1998) Ablation of cerebellar Golgi cells disrupts synaptic integration involving GABA inhibition and NMDA receptor activation in motor coordination. Cell 95:17-27.
5. Watanabe, D. & Nakanishi, S. (2003) mGluR2 postsynaptically senses granule cell inputs at Golgi cell synapses. Neuron 39:821-829.