

## 第87回関西実験動物研究会

### 個体レベルの遺伝子操作による中枢神経系の発生と機能の解析

#### 2. 代謝型グルタミン酸受容体遺伝子操作マウスを用いた小脳の機能解析

饗場 篤 (神戸大学大学院医学系研究科)

代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)は三量体 G 蛋白質と共役し、8種の遺伝子が同定されている。そのうち、mGluR1 は中枢神経系で小脳、嗅球、視床等で強く発現し、Gq ファミリー蛋白質と共役してプロテインキナーゼ C(PKC)活性や細胞内カルシウム濃度を調節している。また、mGluR1 には長い細胞内 C 末端を持つ mGluR1a やそれを欠いた mGluR1b 等スプライシングの違いにより、複数のサブタイプがあることが知られている。我々は、mGluR1 欠損マウスを作製し、mGluR1 の発現の特に強い小脳プルキンエ細胞を中心に解析した。1 個の成熟プルキンエ細胞は 10 - 20 万本の平行線維と 1 本の登上線維からの興奮性入力を受けている。mGluR1 欠損マウスでは、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達の異常、平行線維-プルキンエ細胞シナプスでのシナプス伝達の可塑性(長期抑圧)の異常、運動失調等が見られ、これらの機能に mGluR1 が必須であることが明らかとなった。また、mGluR1 欠損マウスに mGluR1cDNA を発現させるトランスジーンを導入し、プルキンエ細胞特異的に mGluR1a サブタイプを発現するマウス (mGluR1a レスキューマウス)を作製した。mGluR1a レスキューマウスでは欠損マウスで見られたこれらの異常が全て正常に戻っていることから、欠損マウスで見られた小脳依存的な表現型は全てプルキンエ細胞で発現する mGluR1 の欠損が原因であることが明らかとなった。一方、mGluR1 スプライスバリエーションの内 mGluR1b は、Gq ファミリーとの共役およびその下流分子の活性化は可能であるが、mGluR1a に存在する Homer との結合に必須な proline-rich モチーフや PDZ ドメインを持つシナプス後部に存在する足場蛋白質が結合する PDZ 結合モチーフを欠いている。従って、mGluR1b サブタイプのみを発現するマウスを作成し、その表現型を解析することにより、これらの蛋白質のシナプス伝達、可塑性における機能を同定することができる。mGluR1b をプルキンエ細胞特異的に発現させた mGluR1b レスキューマウスでは運動失調が見かけ上なくなり、ローターロッド試験での運動協調能がレスキューされた。また、ウェスタンブロット解析により、mGluR1b レスキューマウス小脳での mGluR1 蛋白質発現量が mGluR1a レスキューマウスよりも多いこと、mGluR1b 蛋白質の免疫沈降産物には Homer 蛋白質が含まれないことが明らかとなった。一方で、mGluR1b レスキューマウスでは、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達の異常、連合学習である瞬目反射の条件付けの delay 課題はレスキューされなかった。さらに、初代培養プルキンエ細胞を用いた実験では mGluR1b レスキュー細胞では野性型および mGluR1 レスキュー細胞で観察される mGluR1 アゴニストによる細胞内カルシウムの上昇の維持ができないことがわかった。すなわち、mGluR1a の長い細胞内 C 末端と相互作用する Homer 等のシナプス後部に存在するアダプター蛋白質や足場蛋白質は、プルキンエ細胞での mGluR1 依存的なシグナルのうちでも、運動協調に必要なシグナル伝達には必須ではないが、登上線維シナプスの生後発達、瞬目反射の連合学習、mGluR1 依存的な細胞内カルシウム濃度の持続的な上昇に必要であることが明らかとなった。