

原

著

電位依存性カルシウムチャネル γ -8 遺伝子 欠失誘導型マウスの作製

長谷川 仁

新潟大学脳研究所脳神経外科学分野

(主任：田中隆一教授)

Generation of VDCC γ -8 Conditional Knockout Mice

Hitoshi HASEGAWA

Department of Neurosurgery,

Brain Research Institute, Niigata University

(Director: Prof. Ryuichi TANAKA)

要 旨

小脳運動失調と欠伸てんかんを特徴とする変異マウス Stargazer の解析により、その原因遺伝子である stargazin (VDCC γ -2) が AMPA 型受容体と機能的に密接な関係にあることが示された。この分子と相同性が高い電位依存性カルシウムチャネル (VDCC) γ -3, 4, 7, 8 も、AMPA 型受容体の機能発現に重要な補助的サブユニットであることが示唆されているが、個体レベルでの解析に乏しく、その機能や役割分担については未解明の部分が多い。本研究では海馬で高い発現を示す γ -8 サブユニットに着目し、海馬 CA3 特異的にこの分子を欠失させ、AMPA 型受容体を介した脳の分子機構の解明を計画した。そのために Cre/loxP システムにより、部位・時期特異的に VDCC γ -8 を欠失できるマウス γ -8-flox 系統を樹立した。そしてこのマウスと全身で Cre リコンビネースを発現するマウスとを交配することにより VDCC γ -8 が Cre 活性依存的に欠失することを確認した。さらに、VDCC γ -8 の欠失は、AMPA 型受容体のタンパク発現に選択的に影響を及ぼすことも示唆された。本研究で樹立した VDCC γ -8 KO マウスは、特に AMPA 型受容体の関与する神経分子機構の個体レベルでの解析において有用なツールとなると考えられる。

キーワード：VDCC γ サブユニット，コンディショナルターゲティング法，Cre/loxP システム，flox マウス，KO マウス，AMPA 型受容体

Reprint requests to: Hitoshi HASEGAWA
Department of Neurosurgery
Brain Research Institute Niigata University
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学脳研究所脳神経外科学分野 長谷川 仁

はじめに

Stargazin は4回膜貫通領域とC末端にPDZ結合ドメインを持つタンパク質であり、小脳の運動失調とてんかんの一形態である欠伸てんかん(absence epilepsy)を示す変異マウス stargazer マウスの原因遺伝子として同定された¹⁾。このマウスの解析において小脳顆粒細胞でのAMPA型グルタミン酸受容体応答の消失が報告されたことから²⁾、StargazinとAMPA型受容体が機能的に密接な関係にあることが示唆された。その後、Stargazin cDNAを小脳顆粒細胞に発現させるとAMPA応答が回復することが示され、StargazinがAMPA型受容体を細胞表面に出現させるというモデルが提唱された³⁾。さらに近年、この分子がAMPA型受容体のチャネル活性を直接に調節する補助的サブユニットであることが山崎ら⁴⁾により示された。この知見は、Tomita等⁵⁾によって最近になり確認された。

Stargazinは電位依存性Ca²⁺チャネル γ -1サブユニット(VDCC γ -1)と相溶性が高いことからVDCC γ -2と名付けられている。他にも、これらの分子と相溶性のある遺伝子が哺乳動物のゲノム上には6個コードされており、VDCC γ -3 \sim γ -8と呼ばれている⁶⁾。小脳顆粒細胞やXenopus oocyteを用いた解析などから、 γ -2以外に γ -3, 4, 7, 8もAMPA型受容体のチャネル活性の上昇や細胞表面への出現を促進することが示されており³⁾⁻⁵⁾⁷⁾⁸⁾、AMPA型受容体の機能発現に必須な補助的サブユニットであると推定されている。これらの γ サブユニットは脳において相補的な発現パターンを示し、Stargazinは小脳に、 γ -3は大脳皮質に、 γ -4はほぼ脳全体に分布するが、特に線条体とグリア細胞に、そして γ -8は海馬においてそれぞれ高い発現を示す⁷⁾。Stargazin以外の分子では個体レベルでの解析に乏しく、その機能や役割分担については未解明の部分が多い。

そこで、本研究では海馬で高い発現を示す γ -8サブユニットに着目し、海馬CA3特異的にこの分子を欠失させ、AMPA型受容体を介した脳の分

子機構の解明を計画した。そのため、遺伝子ノックアウトが誘導可能なCre/loxPシステムによるコンディショナルターゲティング法を用いて、マウスを作成することにした。

材料と方法

γ -8 遺伝子のクローニングとターゲティングベクターの作成

C57BL/6マウスのゲノムをテンプレートとしてPCRを行い、プライマーG8in-F (5'-AGGGC ATAGCACTATAACCC-3')、G8e2-R (5'-ACG-TACGGAGCAGGTACTCC-3')を用いて6.5kbp、G8e2-F (5'-CGTGAAGATCAACCACTTCC-3')、G8-6 (5'-TACATGGAGATGTCCGTGGA-3')を用いて4.1kbpのDNA断片を増幅した。これらのPCR産物をpBluescript II KS(-)のEcoRVサイトにサブクローニングし、それぞれp5'-1, p3'-1を得た。

次に、これらのサブクローンを用いてターゲティングベクターを作製した。p3'-1をテンプレートとしてXho I リンカーをつけたプライマーP5' (5'-CCCCTCGAGCCAGAGTGGCAGAATAAGGG-3')とP3' (5'-CCCCTCGAGTACTCACAGTCTGAGCAGGC-3')を用いたPCR(pfuUltra High-Fidelity DNA polymerase, Strategene)を行い、PCR産物をXho Iで消化して486bpのフラグメントを得た。このフラグメントを、ERT配列で挟んだpgk-neo-pAカセットの両端にloxP配列を挿入した配列を持つpBluescriptをベースにしたベクターpNeo-MC/lox #5のXho Iフラグメント5kbpとライゲーションし、pG8-Neoloxとした。また、p3'-1をテンプレートとして、Kpn I リンカーをつけたプライマーG8-K3F (5'-CCCGGTACCTAGCCTGCTCAGACTGTGAG-3')とG8-K3R (5'-CCCGGTACCTACATGGAGATGTCCGTGGA-3')を用いたPCRを行った。得られたPCR産物をKpn Iで消化して、2.9kbpのフラグメントを作成した。このフラグメントとpMC1DTApAのNot I-Hind III(平滑化)にマルチクローニングサイトを挿入したベクター

pDT-MC # 3 の Kpn I フラグメントをライゲーションして, pG8-DT とした. 5'相同組換え領域は, p5'-1 の Hinc II - BsiW I フラグメント 6.5kbp, および p3'-1 の BsiW I - Kpn I フラグメントである 0.7kbp, pG8-Neolox の Hinc II - Kpn I フラグメントとのライゲーションを行い, pG8-5'Neolox とした. この pG8-5'Neolox の Sal I - Asc I フラグメント 9.4kbp と pG8-DT の Sal I - Asc I フラグメント 7.3kbp をライゲーションして, 全長 16.7kbp のターゲティングベクター tvG8-flox を作成した.

C57BL/6 ES 細胞の培養

遺伝子組換えマウスは C57BL/6 マウス由来細胞株 RENKA 細胞 (崎村らが樹立) を用いて作出した. なお, ES 細胞培養の詳細については, 北山ら⁹⁾ の報告に従った.

Sal I にて直線化した tvG8-flox を, 250V, 960 μ F, $R = \infty$ の条件でエレクトロポレーションによりの ES 細胞に導入した. トランスフェクション後 38 から 48 時間後に G418 (175mg/ml) 選別を開始し, 7 日後に耐性コロニーをピックアップした. これらコロニーから DNA を抽出し, サザンブロット解析により標的遺伝子組換えを起こした ES 細胞クローンを同定した. これらの ES 細胞クローンを 8 細胞期の ICR マウス胚にマイクロインジェクションし, 胎胚期まで培養した後, 偽妊娠した ICR マウスの子宮に移植した. 得られたキメラマウスを C57BL/6 マウスと交配して遺伝子組換えマウス系統を樹立した.

サザンブロット解析

ネオマイシン耐性を持つ ES 細胞クローンのゲノム DNA, もしくはマウス尾より抽出したゲノム DNA を Bgl II, Kpn I あるいは Spe I で消化し, 0.6 % あるいは 0.8 % アガロースゲルで電気泳動を行った. これをナイロンメンブレンに転写し 4 種類のプローブ (5', neo, 3', 5'in) を用いてハイブリダイズした¹⁰⁾.

ゲノム DNA をテンプレートとして, プライマー 5'probeF (5'-TCATTTCTCAGTGAGGAGAC-

3') と 5'probeR (5'-AGTAACAATACCCTCTTGGC-3') を用いた PCR を行い, 得られた 356bp の PCR 産物を精製して 5'プローブとした. C57BL/6 の cDNA をテンプレートとして, プライマー 3'probeF (5'-GCGTCACGGTCACAGT-CACC-3') と 3'probeR (5'-GCCTCCACATGCACACAGCA-3') を用いた PCR を行い, 510bp のフラグメントを精製して 3'プローブとした. pGK2Neo¹¹⁾ より Pst I フラグメントの 580bp を精製し, Neo プローブとした. p3'-1 の BsiW I - Kpn I フラグメントである 700bp を精製し, 5'in プローブとした. それぞれのプローブの位置を図 1A に示した.

Bgl II で消化したゲノムでは 5'プローブにより, 野生型 10.5kbp, Neo 型 12.2kbp を検出した (図 1B, 2A). Bgl II で消化した Neo 型のゲノムにおいては Neo プローブにより 5'プローブと同様の 12.2kbp を検出した (図 1B). Kpn I で消化したゲノムでは 3'プローブにより, 野生型 21kbp, Neo 型 13kbp を検出した (図 1B). Spe I で消化したゲノムでは 5'in プローブにより, 野生型 4.6kbp, KO 型 4.2kbp を検出した (図 3A).

PCR 解析

ネオマイシン耐性を持つ ES 細胞クローンのゲノム DNA, もしくはマウス尾より抽出したゲノム DNA をテンプレートとして, プライマー g8-477F (5'-AGTCCGGGCTTCCAGCATCT-3'), と g8-in3R2 (5'-GAGTCTCTAAAACAGCTAGG-3') を用いて KOD Dash (TOYOBO) による PCR を行った. 2 % アガロースゲルを用いた電気泳動により, 野生型 400bp, Neo 型 480bp を検出した (図 1C, 2B). また, プライマー g8-in2F (5'-CTCAGAAACCGCAGAATCTG-3') と g8-in3R2 を用いて PCR を行い, 野生型 840bp, KO 型 420bp を検出した (図 3B).

RT-PCR 解析

野生型および KO マウス大脳より, グアニジン・酸性フェノール法 (ISOGEN, NipponGene, Tokyo, Japan) で total RNA を抽出した. total RNA

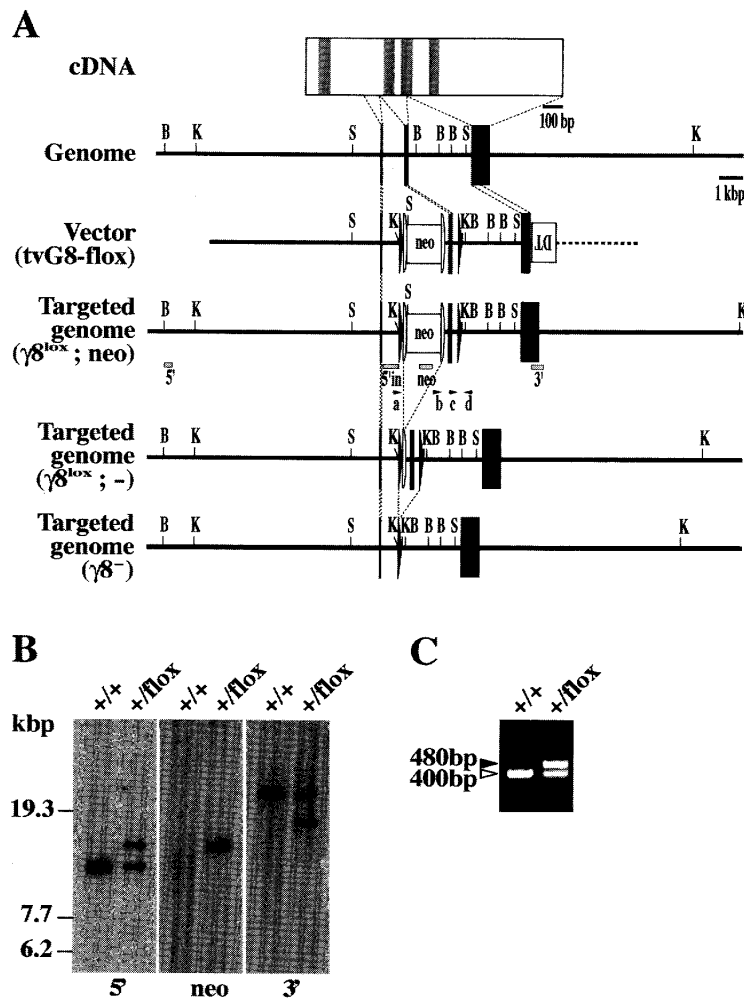


図1 Stargazin family $\gamma 8$ -flox マウスの作製

A. $\gamma 8$ cDNA, 遺伝子, ターゲティングベクター (tvG8-flox), ターゲティング後の遺伝子 ($\gamma 8^{lox}; neo$), FRT 配列間の組換えによりネオマイシン耐性遺伝子を除いた遺伝子 ($\gamma 8^{lox}; -$), loxP 配列間の組み換えによりエクソン3を欠失した遺伝子 ($\gamma 8^{-}$) の構造を示した. cDNA の灰色の部分には膜貫通領域を示している. ターゲティング後の遺伝子構造の下にサザンプロットに用いたプローブを灰色の長方形 (5'; 5'in; neo; 3') で, PCR に用いたプライマー (a, in2F; b, FP-0; c, 477F; d, in3R2) を矢印で示した. 黒い長方形, エクソン; B, Bgl II; K, Kpn I; S, Spe I; 黒い三角形, loxP 配列; 半円, FRT 配列; DT, ジフテリア毒素A断片遺伝子カセット; neo, pgk-neo-pA カセット.

B. ES クローンのサザンプロットによる遺伝子型解析. ES 細胞より抽出したゲノム DNA を Bgl II で消化し, 5'プローブでハイブリダイゼーションを行うと野生型 10.5kbp, $\gamma 8^{lox}; neo$ 型 12.2kbp が検出され, neo プローブでは $\gamma 8^{lox}; neo$ 型 12.2kbp のみが検出される. DNA を Kpn I で消化し, 3'プローブでハイブリダイゼーションを行うと野生型 21kbp, $\gamma 8^{lox}; neo$ 型 13kbp が検出された. マーカーは λ /StyI digest. +/+, 野生型; +/flo, 陽性クローン (111-39).

C. 陽性 ES クローン (111-39) の PCR による遺伝子型解析. ES 細胞より抽出したゲノム DNA をテンプレートとしてプライマー g8-477F と g8-in3R2 間を増幅する PCR を行うと野生型 400bp (\triangleright), $\gamma 8^{lox}; neo$ 型 480bp (\blacktriangleright) が検出された. +/+, 野生型; +/flo, 陽性クローン (111-39).

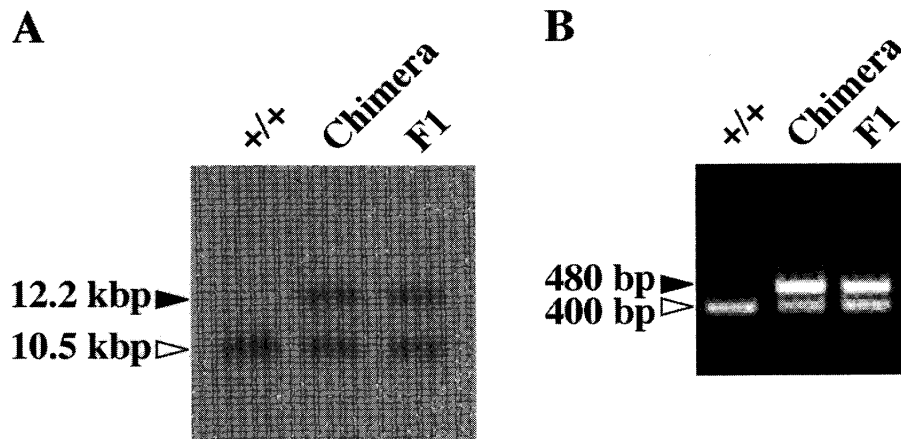


図2 γ 8-flox マウス系統の樹立

- A. キメラマウス及びキメラと C57BL/6 の F1 マウスの尾より抽出したゲノム DNA のサザンブロットによる遺伝子型解析. DNA を Bgl II で消化し, 5'プローブでハイブリダイゼーションを行った. F1 のマウスにおいて野生型 10.5kbp (▷), γ 8^{lox}; neo 型 12.2kbp (▶) が検出された.
- B. 陽性クローンの PCR による遺伝子型解析. ES 細胞より抽出したゲノム DNA をテンプレートとしてプライマー g8-477F と g8-in3R2 間を増幅する PCR を行うと野生型 400bp (▷), γ 8^{lox}; neo 型 480bp (▶) が検出された.

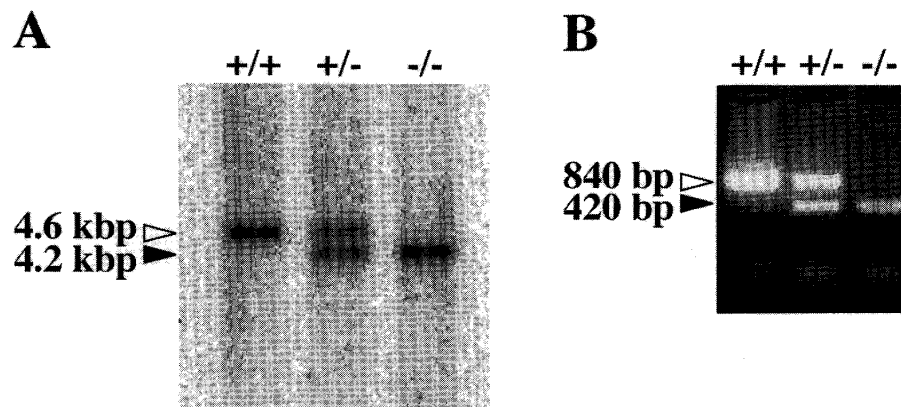


図3 γ 8-null KO マウス系統の樹立

- A. 野生型とヘテロ KO マウスの尾より抽出したゲノム DNA のサザンブロットによる遺伝子型解析. DNA を Spe I で消化し, 5'in プローブでハイブリダイゼーションを行った. 野生型 4.6kbp (▷), γ 8^{lox}; KO 型 4.2kbp (▶) が検出された.
- B. KO マウスの PCR による遺伝子型解析. マウスの尾より抽出したゲノム DNA をテンプレートとしてプライマー g8-in2F と g8-in3R2 間を増幅する PCR を行うと野生型 840bp (▷), KO 型 420bp (▶) が検出された.

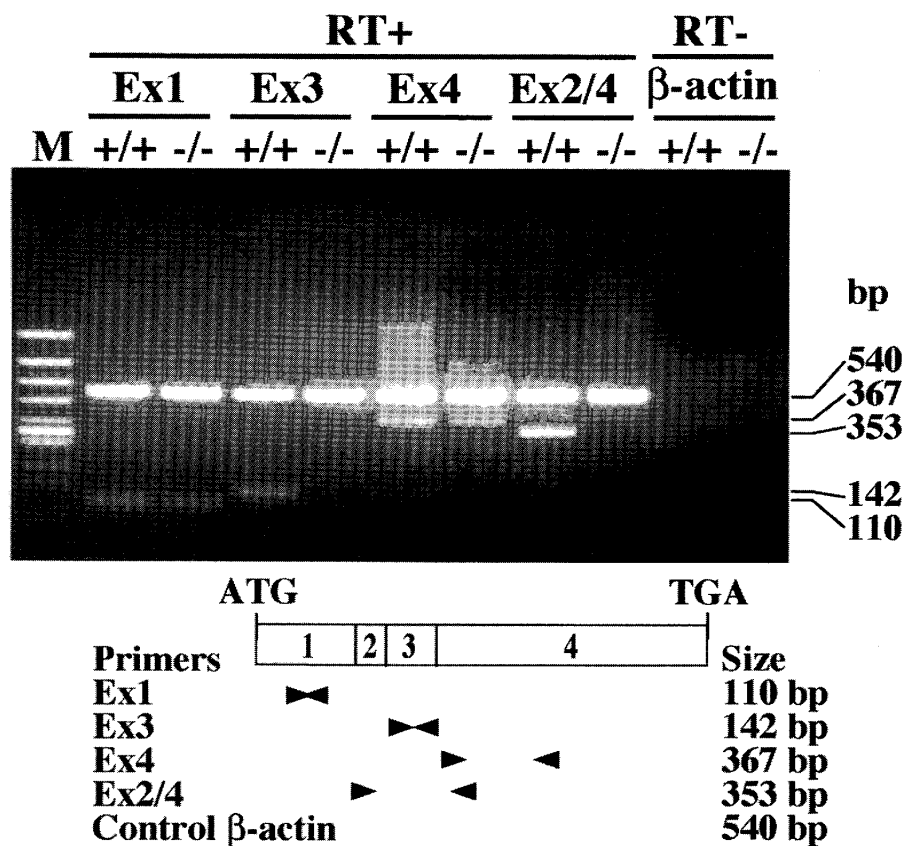


図4 KOマウスの脳における γ -8RNAの発現

マウス大脳 total RNA の RT-PCR を行った。リバーstransクリプターゼ存在下 (RT+) で合成した cDNA の PCR ではコントロールである β -actin のバンドが全てのレーンで検出されているが、非存在下 (RT-) で合成した cDNA の PCR では β -actin のバンドが検出されない。写真下の模式図の白抜き四角は cDNA.1 から 4 はエクソン No である。黒矢頭、プライマー；+/+, 野生型マウス；-/-, KO マウス；M, Φ × 174/HincII digest マーカー。

1 μ g を鋳型として、Advantage RT-for-PCR Kit (CLONTECH, Palo Alto, CA) で、random primer を用い cDNA を合成した。報告されている遺伝子情報を基にしてエクソン 1, 3, 4 の内部、及びエクソン 2 から 4 の間で増幅させる 4 組のプライマーセットを設計した：g8-197F (5'-CGGCTTTTGGCCTCATGACC-3'), g8-306R (5'-ATGGGGTGGTCCGTCATCAC-3'), g8-477F (5'-AGTCGGGGCTTCCAGCATCT-3'), g8-618R (5'-CAAGCCTGCTGCCACGAACA-3'), g8-673F (5'-CCCAAGAGGGACGAGGAGAA-3'), g8-1039R

(5'-GGCTGAGCGTGTACATGGAG-3'), Gene R8F1 (5'-CTGGAAGGGTTGAAAAGAGGTGTC-3'), Gene R8R1 (5'-CCCGCCGAAGTAGAAGGACCA-3')。合成した cDNA をテンプレートとして、KOD Dash (TOYOBO) による PCR を行った。Ex1 primers (g8-197F, g8-306R) で 110bp, Ex3 primers (g8-477F, g8-618R) で 142bp, Ex4 primers (g8-673F, g8-1039R) で 367bp, Ex2/4 primers (Gene R8F1, Gene R8R1) で 353bp が検出された。ポジティブコントロールとして、Mouse β -actin RT-PCR Primer set (TOYOBO)

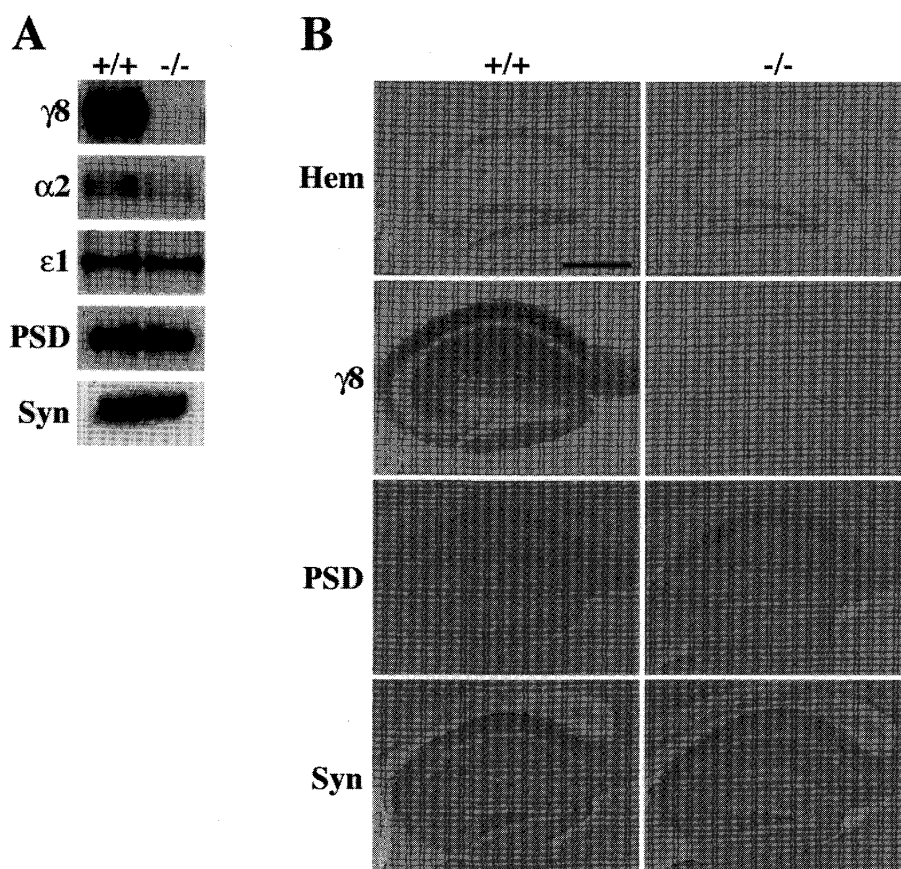


図5 KOにおける γ -8および関連分子タンパクの発現

A. 脳の postnuclear fraction 5 μ g を試料としてウエスタン解析を行った. +/+, 野生型マウス; -/-, KO マウス; γ 8, γ -8 サブユニット; α 2, GluR α 2 サブユニット; ϵ 1, GluR ϵ 1 サブユニット; PSD, PSD-95; Syn, Synaptophysin.

B. 矢状パラフィン切片 (5 μ m) を用いた海馬の染色像. +/+, 野生型マウス; -/-, KO マウス; Hem, 核染色 (ヘマトキシリン); γ 8, γ -8 サブユニット; PSD, PSD-95; Syn, Synaptophysin. スケールバー, 100 μ m.

を用いた (540bp).

ウエスタンブロット解析

摘出した脳をホモジネートバッファー (10mM Tris-Cl pH7.2, 5 mM EDTA, 0.32M スクロース) でホモゲナイズし, 700 \times g で 10 分間遠心の後, 上清の postnuclear fraction を試料とした. BCA 法 (BCA protein Assay kit, Pierce Chemical Co., Rockford, IL) でタンパク濃度を測定し, 脳サンプル 5 μ g, 小脳サンプル 15 μ g を

7%または10% SDS-PAGE で分離した. エレクトロブロット法でニトロセルロースフィルターに転写し, ブロッキング液で室温にて1時間振盪, 一次抗体反応液 (γ -8 サブユニット, PSD-95, GluR α 2 サブユニット, GluR ϵ 1 サブユニット抗体はそれぞれ 0.5 μ g/ml, Synaptophysin 抗体は 0.3 μ g/ml) で1時間, 2次抗体反応液 (ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England), 10,000 倍希釈) で室温にて1時間インキュベ-

トしたのち発色させX線フィルムに感光させた。ブロッッキング剤、発色基質にはECL Advance (Amersham Pharmacia Biotech)を用いた。

組織学的解析

矢状方向に5mm厚で切った脳スライスを、4%パラホルムアルデヒド10mlに12時間浸漬固定し、パラフィン包埋後、ミクロトームにて5 μ m厚の矢状断切片を作製した。切片の脱パラフィン後、ヘマトキシリン染色液により2分間インキュベートすることで核染色を行った。免疫組織化学を行うための切片は、前処理として、脱パラフィン後、0.5mg/mlペプシン溶液で37℃にて8分間インキュベートした。PBSで洗浄した後、ブロッッキング液Aで室温にて30分間、ブロッッキング液Bで室温にて10分間、一次抗体反応液(γ -8サブユニット抗体は5 μ g/ml, PSD-95抗体は3 μ g/ml, Synaptophysin抗体は1 μ g/ml)で4℃にて10時間、2次抗体反応液(ビオチン標識抗ウサギIgG抗体)で室温にて30分間、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン反応液で室温にて20分間インキュベートし、3,3'-diaminobenzidineで発色させた。ブロッッキング液、2次抗体反応液、ストレプトアビジン反応液にはHistoMouse-Plus kit (Zymed, South San Francisco, CA)を用いた。

結 果

γ 8-flox マウス系統の樹立

本研究では、AMPA型受容体の補助サブユニットと考えられるVDCC γ -8の海馬CA3特異的なノックアウトマウス作成を目的として、Cre/loxPシステムを用いた γ -8遺伝子floxマウスを作成した。まず、C57BL/6マウスのゲノムをテンプレートとしてPCRを行い、エクソン2を含む上流6.5kbpと、エクソン2, 3および4の一部を含む4.1kbpのDNA断片を増幅し、サブクローニングしてそれぞれp5'-1, p3'-1を得た。取得したクローンを用いてターゲティングベクターを作製した。欠失させる領域として、膜貫通領域2,

3をコードしたエクソン3を含む486bpをp3'-1からPCRで増幅し、Neo-MC/lox #5ベクターのloxP配列の間に挿入した。また、p5'-1のHincII-BsiWIフラグメント7kbpとp3'-1のBsiWI-KpnIフラグメント0.7kbpを5'相同組換え領域としてneoカセットの上流に挿入し、pG8-5'Neoloxベクターを作製した。エクソン4の一部を含む3'相同組換え領域2.9kbpはp3'-1からPCRを用いて取得し、pDT-MC #3ベクターのKpnIサイトへ挿入し、pG8-DTベクターを作製した。pG8-5'Neoloxベクターの5'相同組換え領域から3'側のloxP配列までを、pG8-DTの3'相同組換え領域の上流に挿入して全長16.7kbpのターゲティングベクターtvG8-floxを作製した(図1A)。

直線化したターゲティングベクターをC57BL/6 ES細胞へエレクトロポレーションした。ネオマイシン耐性を持つ215クローンをKpnIで消化し、3'プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、2個のクローン(No.111-39, 111-53)で野生型の21kbpと変異型の13kbpの2本のバンドを検出した。これらのクローンに対して3'側のloxP配列を検出するPCRを行ったところ、両クローンから野生型の400bpと変異型の480bpの2本のバンドを検出した。さらに、5',neoプローブを用いてサザン解析を行い、相同組換えが正しく起こっていることを確認した。サザン解析、PCR解析の結果を図1B, Cにそれぞれ示した。

相同組換えを確認したES細胞クローンをマウス初期胚にマイクロインジェクションすることにより、キメラマウスを作製した。No.111-39よりES細胞の寄与が大きいキメラマウスが得られ、C57BL/6マウスと交配することによりF1個体を得た。これらF1マウスの尾のゲノムを抽出し、KpnIで消化後、3'プローブでハイブリダイゼーションを行ったところ、約半数の個体で野生型と γ 8^{lox;neo}型が検出された。この結果からキメラマウスよりターゲティングした変異アレルが生殖系列伝達することを確認できた。得られたF1マウスをC57BL/6マウスと交配させ、 γ 8-floxマ

ウス系統を樹立した。系統維持における遺伝子型判定には PCR 解析を用いた。キメラマウスおよび陽性 F1 個体のサザン解析, PCR 解析の結果を図 2A, B にそれぞれ示した。

γ 8-null knockout マウス系統の樹立

γ 8-null knockout (KO) マウスを作製するために、初期胚で Cre リコンビネースを発現し、結果として全身での遺伝子組換えが可能な TLCN-Cre マウス^{12) 13)} と樹立した γ 8-flox マウスを交配した。得られた仔の遺伝子型をサザンプロットにより解析した。DNA を Spe I で消化し、5'in プローブでハイブリダイゼーションを行ったところ、F1 のマウスにおいて野生型 4.6kbp と γ 8-型 4.2kbp が検出された。この結果、標的遺伝子配列をヘテロ欠損 (+/-) したマウスが同定され、 γ 8-flox マウスにおいて Cre リコンビネース依存的に標的遺伝子配列を欠失できることが明らかとなった。さらに、これらの +/- 型マウス同士を交配し、得られた仔の遺伝子型を解析したところ、サザン解析において γ 8-型のバンドのみ検出される -/- 型 (KO) マウスが得られた。系統維持における遺伝子型判定には PCR 解析を用いた。野生型、ヘテロ KO 型、KO 型マウスのサザン解析, PCR 解析の結果を図 3A, B にそれぞれ示した。

KO マウスは野生型と比較して発育や行動に大きな違いは見られなかった。そこで、エクソン 3 の欠失が γ -8 の遺伝子発現に与える影響を解析するため、成体 KO マウスの大脳的全 RNA を用いて RT-PCR を行い野生型と比較した。野生型ではコントロールの β -actin の 540bp とともに、エクソン 1, 3, 4, およびエクソン 2 と 4 のプライマー間の PCR 産物である、110bp, 142bp, 367bp, 353bp が得られた。一方、KO ではエクソン 1 および 4 内部のバンドがそれぞれ検出されたが、欠失させたエクソン 3 の PCR ではコントロールのバンドのみが検出された。また、欠失させたエクソンを挟んだエクソン 2 と 4 のプライマー間の PCR でもコントロールのバンド以外は検出されなかった (図 4)。この結果は、エクソン 3 の欠失

が γ -8 の機能的な mRNA の発現を障害することを示すものである。

γ 8KO マウスにおけるタンパク発現量の検証

VDCC γ -8 サブユニット抗体を用いたウエスタンブロットでは、野生型マウスの大脳タンパクに検出される約 43.5kDa のバンドが、KO マウスには全く検出されなかった。これらの結果は、KO マウスにおいて γ -8 サブユニットタンパクが完全に欠損したことを示す。また γ -8 サブユニットの欠損が大脳に及ぼす影響について調べるため、ウエスタンブロットにより各種のシナプス関連タンパクの発現量を検証した。その結果、プレシナプスマーカー Synaptophysin, ポストシナプスマーカー PSD-95, NMDA 型グルタミン酸受容体 GluR ϵ 1 サブユニットそれぞれの発現量は、野生型マウスと KO マウスの間に顕著な差は認められなかった。一方、大脳に発現する主要な AMPA 型受容体 GluR α 2 サブユニットの発現量は、KO マウスで著しい減少を示した。これらの結果は、 γ -8 サブユニットの欠損は、AMPA 型受容体のタンパク発現に選択的な影響を及ぼすことを強く示唆する。

海馬の組織学的検証

γ -8 サブユニットが強い発現を示す海馬体に着目し、組織学的解析を行った。ヘマトキシリンによる核染色では、海馬体の形態、層構造、細胞密度等に野生型と KO マウスで顕著な差は認められなかった。VDCC γ -8 サブユニット抗体による免疫組織化学では、野生型マウスで非常に強い染色像が得られた。特に強く染色されたのは CA1 放射状層、上昇層であった。CA1 及び CA3 の網状分子層、CA3 放射状層、上昇層や海馬台は強く染色され、歯状回分子層、CA3 透明層では比較的弱く染色された。また、CA1 及び CA3 錐体細胞層、歯状回顆粒細胞層に染色は認められなかった。しかし、KO マウスではこれらの染色は全く認められなかった。プレシナプスマーカー Synaptophysin, ポストシナプスマーカー PSD-95 に対する抗体を用いた免疫組織化学では、野生型、KO マウス

とも、それぞれほぼ同じ染色像が得られた。これらの結果から、VDCC γ -8サブユニットは海馬体のシナプスに強く発現しているが、この分子は、海馬体の構造形成やシナプス機能分子の分布には大きな影響を与えないことが示唆される。

考 察

本研究では、Cre/loxP システムを用いて部位・時期特異的に stargazin 関連分子 VDCC γ -8 サブユニット遺伝子を欠失するために、Cre の標的配列である loxP でエクソン 3 を挟んだ γ 8-flox マウス系統を樹立した。 γ -8 サブユニット遺伝子は 4 つのエクソンで構成されており、4 つの膜貫通領域がエクソン 1, 3, 4 にコードされている。エクソン 3 は膜貫通領域 2, 3 をコードすること、塩基数が 140 であり、このエクソンの欠失によりフレームシフトが期待できることから標的遺伝子組換え領域として選択した。樹立した γ 8-flox マウスは Cre 発現マウスとの交配により γ -8 遺伝子のエクソン 3 の欠失が示された。また、エクソン 3 ホモ欠失マウス的大脑において γ -8 の mRNA 及びタンパクの欠損が認められた。この結果は、海馬 CA3 特異的 Cre 発現マウスとの交配することによりコンディショナル KO マウスを得ることが可能であることを意味する。

γ -8 は、興奮性のシナプス伝達を担う主要なグルタミン酸受容体である AMPA 型受容体の補助的なサブユニットであることが示唆されている。小脳で多く発現する γ -2 サブユニットはこの分子の欠失マウスである Stargazer の解析により個体レベルでの知見が得られ、小脳における AMPA 型受容体の機能の解析が進みつつある。しかしながら、他の γ サブユニットに関しては個体レベルでの知見がほとんど無い。本研究で得られた γ 8-flox, γ 8-KO マウスによって、脳における AMPA 型受容体と γ -8 サブユニットの機能を個体レベルで検討することが可能になる。

これまでの知見から小脳に多く発現する γ -2 欠失マウス (Stargazer) の小脳で GluR α 2 サブユニットの発現量が減少する一方、NMDA 型グ

ルタミン酸受容体の GluR ϵ 1 サブユニットの発現量が変化しないことが示されていた⁷⁾。我々の作製した γ -8 Null KO (エクソン 3 ホモ欠失) マウスでは大腦において AMPA 型受容体である GluR α 2 サブユニットの発現量が著しく減少し、NMDA 型グルタミン酸受容体の GluR ϵ 1 サブユニットの発現量に顕著な変化は認められなかった。このことは、 γ -8 が大腦の AMPA 型受容体の主要な機能制御分子であることを示唆しており、また γ -8 サブユニットの抗体による免疫組織化学で野生型の海馬体において AMPA 型受容体が多く発現する領域が強陽性であることから支持される (図 5B)。

グルタミン酸受容体は、従来より脳虚血との関係が示唆され、数多くの報告がなされてきた。虚血性神経細胞死の機構においては、最初期におこるグルタミン酸サージが最も重要な現象として認識され、治療薬の開発等が試みられたが、ブレイクスルーとなるような知見が得られていないのが現状である。しかし、興味深いことに、虚血動物における non-NMDA 型受容体サブユニットの遺伝子発現の解析から虚血後一日経つと、Ca²⁺透過性の高い受容体が増えている。つまり GluR α 2 が減っているという報告もあることから¹⁴⁾、本研究における AMPA 型受容体制御分子である γ ファミリーを解析することにより、未だ有効な治療法がないとされる虚血性脳疾患に対して、新たな側面からアプローチできる可能性があると考えられる。

謝 辞

脳研究所細胞神経生物学分野において、ターゲティングベクター作製を指導してくださった辻田実加さん、ES 細胞培養を担当してくださった阿部学さん、マイクロインジェクションを担当してくださった夏目理恵さん、直接御指導くださった崎村建司教授に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J,

- Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS 2nd, Mori Y, Campbell KP and Frankel WN: The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca^{2+} -channel gamma subunit. *Nat Genet* 19: 340 - 347, 1998.
- 2) 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.
- 3) Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS and Nicoll RA: Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408: 936 - 943, 2000.
- 4) Yamazaki M, Ohno - Shosaku T, Fukaya M, Kano M, Watanabe M and Sakimura K: A novel action of stargazin as an enhancer of AMPA receptor activity. *Neurosci Res* 50: 369 - 374, 2004.
- 5) Tomita S, Adesnik H, Sekiguchi M, Zhang W, Wada K, Howe JR, Nicoll RA and Brecht DS: Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature* [Epub ahead of print] 2005.
- 6) Chu PJ, Robertson HM and Best PM: Calcium channel gamma subunits provide insights into the evolution of this gene family. *Gene* 280: 37 - 48, 2001.
- 7) Tomita S, Chen L, Kawasaki Y, Petralia RS, Wenthold RJ, Nicoll RA and Brecht DS: Functional studies and distribution define a family of trans-membrane AMPA receptor regulatory proteins. *J Cell Biol* 161: 805 - 816, 2003.
- 8) Tomita S, Fukata M, Nicoll RA and Brecht DS: Dynamic interaction of stargazin-like TARPs with cycling AMPA receptors at synapses. *Science* 303: 1508 - 1511, 2004.
- 9) Kitayama K, Abe M, Kakizaki T, Honma D, Natsume R, Fukaya M, Watanabe M, Miyazaki J, Mishina M and Sakimura K: Purkinje cell-specific and inducible gene recombination system generated from C57BL/6 mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 1134 - 1140, 2001.
- 10) Nagasawa M, Sakimura K, Mori KJ, Bedell MA, Copeland NG, Jenkins NA and Mishina M: Gene structure and chromosomal localization of the mouse NMDA receptor channel subunits. *Mol Brain Res* 36: 1 - 11, 1996.
- 11) Yagi T, Nada S, Watanabe N, Tamemoto H, Kohmura N, Ikawa Y and Aizawa S: A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene. *Anal Biochem* 214: 77 - 86, 1993.
- 12) Nakamura K, Manabe T, Watanabe M, Mamiya T, Ichikawa R, Kiyama Y, Sanbo M, Yagi T, Inoue Y, Nabeshima T, Mori H and Mishina M: Enhancement of hippocampal LTP, reference memory and sensorimotor gating in mutant mice lacking a telencephalon-specific cell adhesion molecule. *Eur J Neurosci* 13: 179 - 189, 2001.
- 13) Fuse T, Kanai Y, Kanai - Azuma M, Suzuki M, Nakamura K, Mori H, Hayashi Y and Mishina M: Conditional activation of RhoA suppresses the epithelial to mesenchymal transition at the primitive streak during mouse gastrulation. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 665 - 672, 2004.
- 14) Pellegrini - Giampietro DE, Zukin RS, Bennett MV, Cho S and Pulsinelli WA: Switch in glutamate receptor subunit gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10499 - 10503, 1992.

(平成 17 年 6 月 28 日受付)