

脳発達時期に発現する NMDA 受容体チャネル $\epsilon 2$, $\epsilon 4$ サブユニットの機能的差違

新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野 (主任: 崎村建司教授)

柿崎利和

Functional Difference Between $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ Subunits of
NMDA Receptor Channel in the Developmental Mouse Brain

Toshikazu KAKIZAKI

*Department of Cellular Neurobiology,
Brain Research Institute, Niigata University
(Director: Prof. Kenji SAKIMURA)*

The N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of the glutamate receptor (GluR) channel plays roles in synaptic plasticity as a molecular coincident detector and in neuronal pattern formation during development. NMDA receptor channels are composed of the GluR ϵ (NR2) and GluR ζ (NR1) subunits. There are four GluR ϵ subunit genes, although GluR ζ subunit variants are derived from a single gene. The molecular composition of NMDA receptor channels varies depending on the location and developmental stage of brain. At the embryonic stage, GluR $\epsilon 2$ mRNA is expressed in the entire brain, while GluR $\epsilon 4$ mRNA is expressed only in the diencephalon and brainstem. Therefore, I focused on the GluR $\epsilon 2$ and GluR $\epsilon 4$ subunits to determine their functions during development. I produced a mutant mouse line ($\epsilon 4-E2$), which expressed GluR $\epsilon 2$ protein under the GluR $\epsilon 4$ gene promoter, by inserting $\epsilon 2$ cDNA into GluR $\epsilon 4$ subunit gene with the homologous recombination. In this mutant mice, I found GluR $\epsilon 2$ appeared instead of GluR $\epsilon 4$, and compared its behavioral phenotype with that of the GluR $\epsilon 4$ knockout mouse. The $\epsilon 4-E2$ mutant mice showed a significantly lower spontaneous activity than that of the GluR $\epsilon 4$ knockout mice. On the other hand, there was no significant difference in the spontaneous activity between the GluR $\epsilon 4$ mutant mice and wild-type mice. These results suggest that

Reprint requests to: Toshikazu KAKIZAKI,
Department of Cellular Neurobiology,
Brain Research Institute,
Niigata University, 951-8585 JAPAN.

別刷請求先: 〒951-8585 新潟市旭町通1-757
新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野

柿崎利和

the GluR $\epsilon 2$ and GluR $\epsilon 4$ are distinct in functional properties and GluR $\epsilon 2$ cannot compensate the function of GluR $\epsilon 4$.

Key words: NMDA receptor channel, GluR $\epsilon 2$, GluR $\epsilon 4$,
homologous recombination, spontaneous activity
NMDA 受容体チャネル, GluR $\epsilon 2$, GluR $\epsilon 4$, 相同組換え, 自発的活動性

緒 言

グルタミン酸受容体チャネル (GluR) の一種である N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体チャネルは、記憶・学習の基礎過程とされているシナプス可塑性や、発生過程における細胞移動や神経のパターン形成、シナプス形成などに関与することが、報告されている¹⁾⁻⁴⁾。

NMDA 受容体チャネルは、グルタミン酸を結合する GluR ϵ (NR2) とグリシンを結合する GluR ζ (NR1) サブユニットより構成されている⁵⁾⁻⁸⁾。GluR ζ サブユニットの遺伝子は 1 種類しか知られていないが^{5) 9)}、GluR ϵ サブユニットには 4 種類の遺伝子が存在する⁶⁾⁻⁸⁾。異種細胞発現系を用いた研究により、NMDA 受容体チャネルは、構成している GluR ϵ サブユニットの種類によってそのチャネル特性が決定されており、機能的に多様であることがわかっている^{6)-8) 10)}。さらに、GluR ϵ サブユニットの発現は、発生段階に従ってそれぞれ特徴的な局在を示すことが示されている¹¹⁾。このことは、発生段階に従って、脳内の NMDA 受容体チャネルの特性が変化することを意味し、NMDA 受容体チャネルが、生体において多様な機能を発揮していることが予想された。標的遺伝子組換え法により、GluR ϵ サブユニットの生体における生理機能が調べられてきた。GluR $\epsilon 1$ 欠損マウスでは、海馬 CA1 領域における長期増強 (LTP) の減弱と、空間および文脈依存学習の障害が認められ、GluR $\epsilon 1$ が記憶・学習に関与していることがわかった^{12) 13)}。一方、GluR $\epsilon 2$ 欠損マウスは生後間もなく死亡し、脳幹の三叉神経脊髄路核におけるバレル構造の形成不全と、海馬 CA1 領域における長期抑圧 (LTD) の消失が認められた¹⁴⁾。これは、GluR $\epsilon 2$ は発生過程における神経のパターン形成のほか、シナプス可塑性にも関与していることを示す。GluR $\epsilon 3$ 欠損マウスでは明瞭な障害は認められなかったものの¹⁵⁾、GluR $\epsilon 4$ 欠損マウスでは、自発的活動量の減少が認められた¹⁶⁾。これらの研究により、GluR ϵ サブユニットの生理機能は多様であることが示された。

しかし、NMDA 受容体チャネルの多様性を決定している GluR ϵ サブユニットの発現領域は、互いに重複している部分が多い¹¹⁾。これら発現を共にする GluR ϵ サブユニットが、生理機能に対してどのように貢献しているかということは、解決されるべき重要な問題である。

本研究の目的は、発達時期における NMDA 受容体チャネルの機能を明らかにすることにある。そのために、発生初期から生後の幼若期にかけて間脳・脳幹部に共に発現している GluR $\epsilon 2$ と GluR $\epsilon 4$ に着目し¹¹⁾、GluR $\epsilon 2$ と GluR $\epsilon 4$ の生理機能について調べることとした。まず、GluR $\epsilon 4$ 遺伝子のプロモーターで GluR $\epsilon 2$ を発現する変異マウスを作製し、この変異マウスが、GluR $\epsilon 4$ 欠損マウスの生理機能を補償できるかを調べることにより、生体における GluR $\epsilon 2$ と GluR $\epsilon 4$ の機能発現について検討した。

材料と方法

$\epsilon 4$ - E2 変異マウスの作製

GluR $\epsilon 4$ のゲノムのサブクローン $\lambda \epsilon 4 - 1$ ¹⁶⁾ から由来する 5.2 kb の EcoRI 断片を、pBluescript II SK (-) (Stratagene) の EcoRI 切断部位に連結することにより、pE4GE1 を得た。EcoRV 消化した pE4GE1 を再連結することにより pE4GE2 を得た。BamHI-EcoRI 消化後末端平滑化した pE4GE2 を再連結することにより pE4GE3 を得た。pE4GE3 の Sall-KpnI 切断部位に、3 フレームのストップコドンを含む合成オリゴマー

5'-TCGAGTGACTGATTAGAATTCGCTAGGA
3'-CACTGACTAATCTTAAGCGATCCT
TCCGTCGACGGTAC-3'
AGGCAGCTGC-5'

を連結することにより pE4GE4 を得た。pE4GE4 の BamHI 切断部位に、SV40 ウイルスのスモール t イントロンとポリ A 付加部位を含み、BamHI 切断部位を末端平滑化した 0.9 kb の BstYI-BamHI 断片と、ホスホグリセリン酸キナーゼ (pgk) プロモーター駆動性ネオマイシン耐性遺伝子を含み、両側を末端平滑

化した 1.3 kb の EcoRI-BamHI 断片を連結することにより pE4N1 を得た。pBluescript II KS (-) の EcoRI-SmaI 切断部位に、IRES を含む 0.6 kb の EcoRI-NcoI 断片と、pSPGR ϵ 2¹⁷⁾ から由来する 0.2 kb の NcoI-SmaI 断片を連結することにより pIRE1 を得た。IRES は Encephalomyocarditis virus (EMCV) の mRNA の 5' 非翻訳領域 (UTR) 由来の配列で、天然の開始コドンに変異を導入してある¹⁸⁾。pIRE1 から由来する 2.3 kb の NcoI-ScaI 断片と、GluR ϵ 2 の cDNA の開始メチオニンから SfiI 切断部位までを含む約 60 b の NcoI-SfiI 断片と、pBKSA ϵ 2⁷⁾ から由来する 5.9 kb の SfiI-ScaI 断片を連結することにより pIRE2 を得た。pIRE2 から由来する 5.4 kb の EcoRI 断片を、pE4N1 の EcoRI 切断部位に連結することにより pE4IRE2N を得た。pIRE2N から由来する 9.2 kb の NotI-SalI 断片を、pTVGR ϵ 4¹⁷⁾ の NotI-XhoI 切断部位に連結することにより pTV ϵ 4IR ϵ 2 を得た。

NotI 消化により直線化した 6 pmol の pTV ϵ 4IR ϵ 2 を、 1×10^7 個の TT 2 胚性幹細胞 (ES 細胞) に、電気穿孔法 (電圧 0.25 kV, 容量 960 mF, 抵抗 ∞) で導入した後、200 mg/ml の G 418 含有培地で 7~8 日間培養し選別を行った。相同組換え体の同定は、PCR とサザンブロット解析により行った。

サザンブロット解析

相同組換え体の同定では、培養した ES 細胞クローンからゲノム DNA を抽出し、これを BamHI または BglII により消化し、0.8% のアガロースゲル電気泳動で分離し、Probe A または Probe B でハイブリダイゼーションした。変異マウスの遺伝子型解析では、成体マウスの尾先端からゲノム DNA を抽出し、これを EcoRI 消化し、0.8% のアガロースゲル電気泳動で分離し、Probe C でハイブリダイゼーションした。

RT-PCR 解析

生後 7 日齢の変異マウスの全脳から ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて全 RNA を抽出し、これを 1 単位の DNaseI で消化したものを全 RNA 試料とした。全 RNA 試料に対して、RT-PCR high (TOYOBO) を用いて RT-PCR を行った。Random Primer (RT-PCR high 添付) を用いて逆転写反応を行い、3 種類のプライマー (P1, P2 および P3) を用いて PCR を行った。反応産物を 8% のポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、これを臭化エチジウム染色することにより核酸成分を検出した。

ウエスタンブロット解析

生後 0.5 日齢の変異マウスの間脳・脳幹からホモジネートを調製し、これを 700 \times g で 10 分間遠心分離することにより得られた除核画分をもってタンパク試料とした。Lowry 法によりタンパク定量を行った。タンパク試料の 2, 10 および 100 μ g を 7.0% (GluR ϵ 2 タンパク検出用) および 12.5% (ニューロン特異的エノラーゼ (NSE) タンパク検出用) の SDS-PAGE で分離した。エレクトロブロット法によりニトロセルロースフィルターに転写し、ブロッキング (5% スキムミルクで室温, 1 時間振とう), 一次抗体反応 (抗 GluR ϵ 2 抗体は 1 μ g/ml で 2 時間, 抗 NSE 抗体は 0.172 μ g/ml で 1 時間反応), 二次抗体反応 (4000 倍希釈した, 西洋ワサビのペルオキシダーゼ (HRP) で標識された抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham) で 1 時間反応) を行い, ECL (Amersham) にて発色させ X 線フィルムに感光させた。

行動解析

マウスの飼育は、水と餌を自由に摂取できる環境下で行った。飼育室は 12 時間の明暗サイクルが維持されており、全ての行動解析は、この明時間帯の範囲内で行った。生後 27~28 日を経過した個体を用いて、小さいオープンフィールドによる実験を行い、その後母親を分離して飼育した。生後 35~76 日を経過した個体を用いて、大きいオープンフィールドによる実験を行った。

変異マウスの活動性を、昼間 (9:00~18:00)、室温 (14~21 $^{\circ}$ C) の条件下で調べた。実際の測定には、Activity Monitor version 2.01 (ニューロサイエンス) (小さい面積のオープンフィールド, 27.3 cm \times 27.3 cm) と BTA-1 (室町機械) (大きい面積のオープンフィールド, 50cm \times 50cm) の 2 種類の行動軌跡解析装置を用いた。小さいオープンフィールドにおける測定では、0.5 秒以内に 1.6 cm 以上、大きいオープンフィールドでは、0.3 秒以内に 2 cm 以上動いたことを以て移動と定義した。

結 果

ϵ 4-E2 変異マウスの作製

GluR ϵ 4 の発現を GluR ϵ 2 の発現で置換したマウスを作製するために、GluR ϵ 4 の遺伝子座に、内部リボソーム導入部位 (IRES) を連結した GluR ϵ 2 の cDNA を挿入した変異マウスを作製した。このホモ変異マウス (以下、この変異遺伝子を ϵ 4-E2 遺伝子、 ϵ 4-E2 遺伝子をもったマウスを ϵ 4-E2 変異マウ

ス ($\epsilon 4 +/E2$) または ($\epsilon 4 E2/E2$) と呼ぶ.) では, GluR $\epsilon 4$ が欠損すると同時に, 内在性の GluR $\epsilon 4$ 遺伝子のプロモーター制御下で GluR $\epsilon 2$ が発現することが期待される (図 1 A). GluR $\epsilon 4$ の遺伝子座に GluR $\epsilon 2$ の cDNA を導入するために, M4 を含む 11.4 kb の GluR $\epsilon 4$ のゲノム DNA 断片に, 5' 末端側に IRES を, 3' 末端側に転写終了シグナルとネオマイシン耐性遺伝子のカセットを連結した GluR $\epsilon 2$ の cDNA を挿入したターゲティングベクター (pTV $\epsilon 4 IR \epsilon 2$) を構築した (図 1 A). 12回のエレクトロポレーションにより, pTV $\epsilon 4 IR \epsilon 2$ を TT2 ES 細胞に導入した. 1580 個の G418 耐性クローンを PCR とサザンブロット解析によりスクリーニングし, 5クローンの相同組換え体 (8-12-1, 8-15-1, 9-41-4, 9-45-4, 11-35-1) を得た (図 1 B). これらの ES 細胞クローンを ICR の 8細胞胚にインジェクションすることによって, 9-45-4 由来のキメラマウスを得た. このキメラマウスと C57BL/6 マウスを交配させることによって, $\epsilon 4-E2$ 変異マウス ($\epsilon 4 +/E2$) を樹立した.

$\epsilon 4-E2$ 変異マウスの生化学的解析

始めに, ($\epsilon 4 +/E2$) マウスと ($\epsilon 4 -/-$) マウスを交配させることで ($\epsilon 4 -/E2$) マウスを得た (図 2 A). この ($\epsilon 4 -/E2$) 個体のゲノム DNA 試料において検出されている野生型 GluR $\epsilon 4$ 遺伝子に由来するバンドは, 野生型 GluR $\epsilon 4$ 遺伝子の重複成分であると考えられた. 得られた ($\epsilon 4 -/E2$) マウス同士を交配させることで, $\epsilon 4-E2$ ホモ変異マウス ($\epsilon 4 E2/E2$) を得た (図 2 B). この $\epsilon 4-E2$ ホモ変異マウスを用いて, $\epsilon 4-E2$ 遺伝子の発現を調べた. $\epsilon 4-E2$ 遺伝子の転写を調べるために, 生後 7 日齢の変異マウスの全脳から抽出した全 RNA を用いて RT-PCR 解析を行った (図 2 C). プライマー P1 および P3 で増幅される, 野生型 GluR $\epsilon 4$ 遺伝子由来の RT-PCR 産物の推定分子量は約 200 bp で, P1 および P2 で増幅される, $\epsilon 4-E2$ 遺伝子由来のそれは 74 bp である. ($\epsilon 4 E2/E2$) および ($\epsilon 4 +/+$) のいずれの RT-PCR 産物においても, 推定分子量に匹敵するバンドが検出された. このことから, $\epsilon 4-E2$ 遺伝子は転写されていることが示された. 次に, $\epsilon 4-E2$ 遺伝子からの GluR $\epsilon 2$ タンパクの発現量を調べた. 内在性の GluR $\epsilon 2$ タンパクを除外し, $\epsilon 4-E2$ 遺伝子から翻訳される GluR $\epsilon 2$ タンパクのみを検出するために, GluR $\epsilon 2$ 変異マウス¹⁵⁾ と $\epsilon 4-E2$ 変異マウ

スを交配させることで, ($\epsilon 2 -/-$, $\epsilon 4 E2/E2$) マウスを作製した. この ($\epsilon 2 -/-$, $\epsilon 4 E2/E2$) マウスでは, 内在性の GluR $\epsilon 2$ が欠損しているのに, $\epsilon 4-E2$ 遺伝子に由来する GluR $\epsilon 2$ タンパクのみを検出できる. 生後 0.5 日齢の ($\epsilon 2 -/-$, $\epsilon 4 E2/E2$) マウスの間脳・脳幹から調製したホモジネートを用いてウエスタンブロット解析を行った (図 2 D). GluR $\epsilon 2$ 欠損マウス ($\epsilon 2 -/-$) には検出されない約 180 kDa の成分が, GluR $\epsilon 2$ のタンパクである¹⁵⁾. ($\epsilon 2 -/-$, $\epsilon 4 E2/E2$) のタンパク試料において, GluR $\epsilon 2$ タンパクの存在を示す確かな強度のシグナルが検出された. ($\epsilon 2 -/-$, $\epsilon 4 E2/E2$) および ($\epsilon 2 +/-$) の試料において検出された GluR $\epsilon 2$ タンパク由来のシグナル強度を比較すると, ($\epsilon 2 -/-$, $\epsilon 4 E2/E2$) のタンパク試料 100 μ g におけるシグナル強度は, ($\epsilon 2 +/-$) の試料 10 μ g におけるそれよりも低い. しかし, ($\epsilon 2 +/-$) の試料 2 μ g におけるシグナル強度は微弱で, 検出感度の限界程度であると思われる. ゆえに, ($\epsilon 2 -/-$, $\epsilon 4 E2/E2$) のタンパク試料中に存在する GluR $\epsilon 2$ のタンパク量は, ($\epsilon 2 +/-$) の試料中に存在するその 2~10% と推定される. このことから, $\epsilon 4-E2$ 遺伝子から GluR $\epsilon 2$ タンパクへの翻訳は行われており, ($\epsilon 4 E2/E2$) 個体における $\epsilon 4-E2$ 遺伝子 (外来性 GluR $\epsilon 2$) の発現量は, 野生型個体における内在性 GluR $\epsilon 2$ のその 5% 以下であることが推測された. また, GluR $\epsilon 2$ 変異マウスとの交配により作製された ($\epsilon 2 -/-$, $\epsilon 4 E2/E2$) マウスは, 生後間もなく死亡し, 成体までは育たなかった.

行動解析

$\epsilon 4-E2$ 変異による効果を調べるため, GluR $\epsilon 4$ 欠損マウス ($\epsilon 4 -/-$) で異常のみられた自発的活動量を, $\epsilon 4-E2$ ホモ変異マウス ($\epsilon 4 E2/E2$) と GluR $\epsilon 4$ 欠損マウス ($\epsilon 4 -/-$) との間で比較することにした. $\epsilon 4-E2$ ホモ変異マウス ($\epsilon 4 E2/E2$) と対照群マウス ($\epsilon 4 -/-$) が同腹仔として得られるようにするために, ($\epsilon 4 -/E2$) マウス同士の交配により, $\epsilon 4-E2$ ホモ変異マウス ($\epsilon 4 E2/E2$) と GluR $\epsilon 4$ 欠損マウス ($\epsilon 4 -/-$) を調達した (図 2 A, B). 変異マウスの自発的活動量を, オープンフィールドテストにより 60 分間測定した (図 3 A). 測定開始直後に最も高い値を示した活動性は, 時間経過とともに減少し, 30 分を経過する頃には, 全ての群のマウスが, オープンフィールドの環境に対して慣れ (habituation) を示し, 活動性は低い定常状態に収束した. 各群の平均値

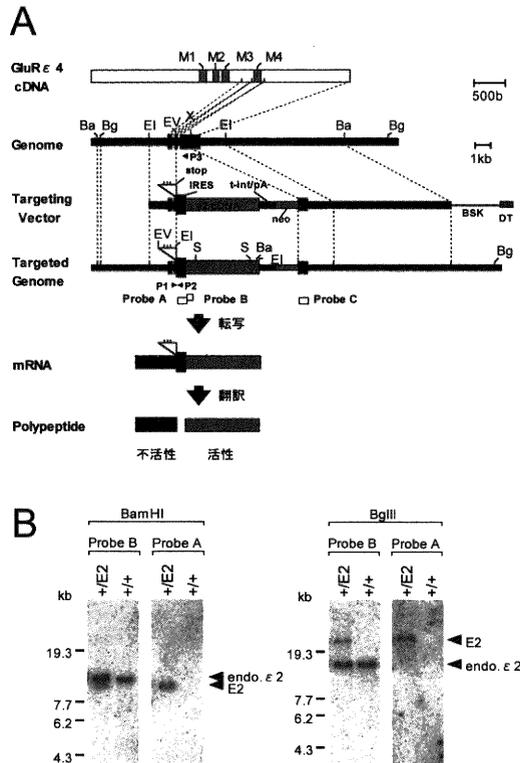


図1 GluR ϵ 4-GluR ϵ 2融合遺伝子発現マウスの作製

- A. 遺伝子組換えおよび発現の概略. GluR ϵ 4の4番目の推定膜貫通領域(M4)をコードする塩基配列の直前にあるEcoRVの認識切断部位から, 約1kb下流にあるXhoIの認識切断部位までの部分に, 相同組換えによりGluR ϵ 2のcDNAを導入した. ターゲティングベクターにおいて, GluR ϵ 2のcDNAの5'末端側にIRESを, 3'末端側に転写終了シグナルとネオマイシン耐性遺伝子のカセットが連結してある. この ϵ 4-E2変異マウスでは, M4の直前までをコードする部分と3フレームのストップコドン, IRES, GluR ϵ 2のcDNAに対応する融合mRNAが合成される. GluR ϵ 4の翻訳は, 3フレームのストップコドンによって一時終了するが, IRESによって再開され, 活性のあるGluR ϵ 2が産生されることが期待される. BaはBamHI, BgはBglII, EIはEcoRI, EVはEcoRV, XはXhoIの制限酵素部位を, stopは3フレームのストップコドン, t-int/pAはsimian virus 40のsmall tイントロンとポリA付加部位, neoはネオマイシン耐性遺伝子のカセット, BSKはプラスミドベクターpBluescript, DTはジフテリア毒素A断片遺伝子, 白四角(Probe A, BおよびC)はサザンブロット解析に用いたプローブの位置, 矢尻(P1, 2および3)はRT-PCRに用いたプライマーの位置を示す.
- B. 相同組換え体の同定. BamHIまたはBglII消化した ϵ 4-E2ヘテロ変異型(ϵ 4+/E2)および野生型(ϵ 4+/+)ゲノムDNAを用いたサザンブロット解析. 左のパネルにおける上および右のパネルにおける下の矢尻は, 内在性のGluR ϵ 2遺伝子(endo. ϵ 2), 左のパネルにおける下および右のパネルにおける上の矢尻は, ϵ 4-E2変異遺伝子(E2)由来のバンドを示す.

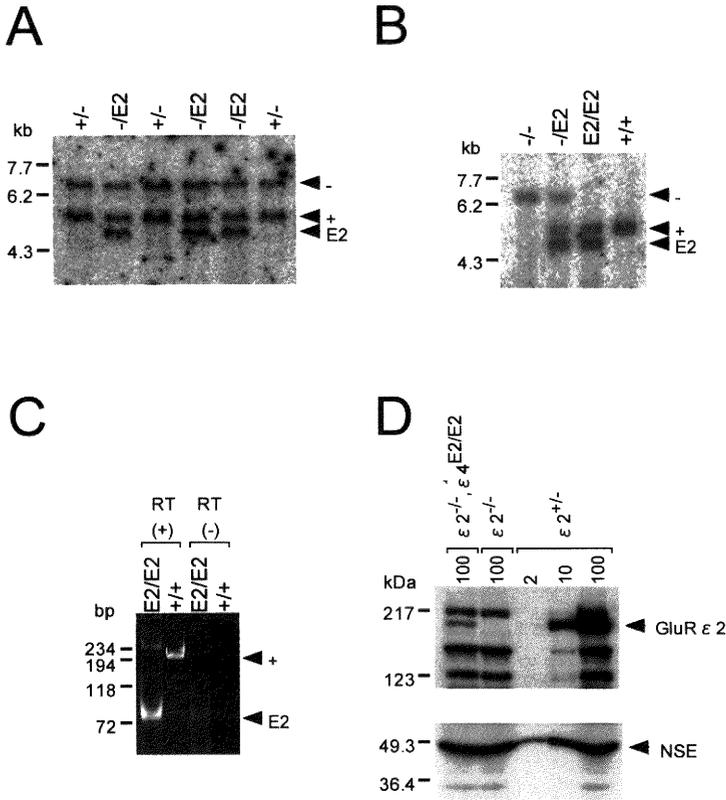


図2 $\epsilon 4$ -E2 ホモ変異マウスの作製と生化学的解析

- A. ($\epsilon 4$ -/E2) マウスの作製. ($\epsilon 4$ +/E2) マウスと ($\epsilon 4$ -/-) マウスの交配により生まれたマウスの尾から抽出したゲノム DNA を, EcoRI で消化し Probe C でハイブリダイゼーションしたサザンブロット解析. 上の矢尻は GluR $\epsilon 4$ の欠失変異型遺伝子 (-), 中央の矢尻は野生型遺伝子 (+), 下の矢尻は $\epsilon 4$ -E2 変異型遺伝子 (E2) 由来のバンドを示す.
- B. ($\epsilon 4$ E2/E2) マウスの作製. ($\epsilon 4$ -/E2) マウス同士の交配により生まれたマウスの尾から抽出したゲノム DNA を EcoRI で消化し Probe C でハイブリダイゼーションしたサザンブロット解析.
- C. $\epsilon 4$ -E2 遺伝子の転写. 生後 7 日齢の $\epsilon 4$ -E2 ホモ変異マウス ($\epsilon 4$ E2/E2) と野生型マウス ($\epsilon 4$ +/+) の全脳から抽出した全 RNA を用いた RT-PCR 解析. RT (+) では逆転写反応を行った後に 3 種類のプライマー (P1, P2 および P3) を用いて PCR を行った反応産物を, RT (-) では逆転写反応を行わずに PCR を行った反応産物を, 8% のポリアクリルアミドゲルで電気泳動している.
- D. $\epsilon 4$ -E2 遺伝子の翻訳. 生後 0.5 日齢の変異マウスの間脳・脳幹から調製したホモジネートタンパク 2, 10, 100 μ g を SDS-PAGE により分離し, 抗 GluR $\epsilon 2$ (上のパネル) および抗 NSE (下のパネル) 抗体により反応させたウエスタンブロット解析. 上の矢尻は GluR $\epsilon 2$ タンパクを, 下の矢尻は NSE タンパクを示す.

の大きさに着目すると、最も活動性が高いのが GluR ϵ 4 欠損マウス群 (-/-) で、野生型マウス群 (+/+) はそれよりも活動性が低い傾向が、60分を通して観察された。3群の活動性の違いを正確に評価するために、30分間の総移動距離を測定した(図3B (オープンフィールドの大きさ(小))). しかし、3群間に有意差はなく(分散分析法, $p > 0.05$), 自発的活動量に違いがないことが示された。このことは、池田らの報告に一致しない。しかし、池田らが解析に用いたオープンフィールドの大きさは 50cm \times 50cm であるのに対して、ここで用いたオープンフィールドの大きさは 27.3cm \times 27.3cm である。このオープンフィールドの大きさの違いが、活動量の相違を引き起こしているのではないかと考えられた。そこで次に、池田らが使用したものと同じ大きさのオープンフィールド(大, 50cm \times 50cm)を用いて、変異マウスの自発的活動量を測定し、同様に30分間の総移動距離を測定した(図3B (オープンフィールドの大きさ(大))). その結果、 ϵ 4-E2ホモ変異マウス群 (E2/E2) の総移動距離が、他の2群のそれに対して有意に低いことが示された(分散分析法および Fisher の PLSD 法, (-/-) - (E2/E2) 群間で $p < 0.05$, (+/+) - (E2/E2) 群間で $p < 0.01$). ゆえに、大きいオープンフィールドにおいては、 ϵ 4-E2ホモ変異マウスの自発的活動量が、GluR ϵ 4 欠損マウスと野生型マウスのそれよりも低いことが示された。

考 察

本研究では、発生初期から生後の幼若期にかけて間脳・脳幹部に共に発現している GluR ϵ 2 と GluR ϵ 4 に着目し、GluR ϵ 2 と GluR ϵ 4 の生理機能の違いについて検討した。この目的のために、GluR ϵ 4 の遺伝子座に、IRES を連結した GluR ϵ 2 の cDNA を導入した ϵ 4-E2 変異マウスを作製した。

ϵ 4-E2 変異マウスにおける RT-PCR 解析とウエスタンブロット解析により、 ϵ 4-E2 遺伝子からの転写、翻訳は行われており、(ϵ 4E2/E2) 個体における ϵ 4-E2 遺伝子(外来性 GluR ϵ 2) の発現量は、野生型個体における内在性 GluR ϵ 2 のその 5% 以下であることが明らかとなった(図2C, D)。ノーザンブロット解析により、 ϵ 4-E2 遺伝子の mRNA への転写量は、野生型 GluR ϵ 4 遺伝子の mRNA へのそれとほぼ同程度であることがわかっている(非掲載データ)。 ϵ 4-E2 遺伝子の mRNA における、IRES を介した再翻訳効率については調べておらず不明であるが、

この翻訳効率が低い可能性が考えられる。図2Dで行ったウエスタンブロット解析では、タンパク試料を生後0.5日齢のマウスの間脳および脳幹から調製した。新生仔期の間脳、脳幹部における GluR ϵ 2 および GluR ϵ 4 の正確な発現量比については不明であるが、新生仔期の間脳、脳幹部における GluR ϵ 4 の発現量は、GluR ϵ 2 のそれよりも少ないということも考えられる。

(ϵ 4-E2) マウスのゲノム DNA を用いたサザンブロット解析により、野生型 GluR ϵ 4 遺伝子の成分が、 ϵ 4-E2 遺伝子に連鎖していると考えられた。しかし、RT-PCR 解析の結果、(ϵ 4+/+) において検出された野生型 GluR ϵ 4 遺伝子由来のバンドに匹敵する増幅成分は、(ϵ 4E2/E2) においては検出されなかった(図2C)。ゆえに、野生型 GluR ϵ 4 遺伝子の重複成分は転写されておらず、不活性であると考えられる。ただし、重複成分が挿入されているゲノム上の正確な位置は同定されておらず、何らかの遺伝子成分を破壊している可能性は否定できない。

ϵ 4-E2ホモ変異マウスの活動性を、大小2種類の大きさのオープンフィールドを用いて調べた(図3)。池田らの報告によると、GluR ϵ 4 欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、自発的活動量が減少していた。本研究で、池田らが用いたものと同じ大きさのオープンフィールド(大, 50cm \times 50cm)とともに、小さいオープンフィールド(小, 27.3cm \times 27.3cm)も用いて、自発的活動量を測定した(図3B)。しかし、いずれのオープンフィールドにおいても、GluR ϵ 4 欠損マウスと野生型マウスの自発的活動量の間、有意差は認められなかった(小(分散分析法, $p > 0.05$), 大(分散分析法, $p < 0.05$, Fisher の PLSD 法, (+/+) - (-/-) 群間で $p > 0.3$)). ϵ 4-E2ホモ変異マウスの遺伝的背景は、C57BL/6 (75%) /CBA (25%) である。行動解析に用いた ϵ 4-E2ホモ変異マウスと GluR ϵ 4 欠損マウスは同腹仔だが、野生型マウスは、C57BL/6 (75%) /CBA (25%) の遺伝的背景を有する、別個の集団から調達した。従って、GluR ϵ 4 欠損マウスと野生型マウス間の遺伝的背景の均一性が低く、そのために、大きいオープンフィールドにおける表現型が、隠れてしまった可能性がある。さらに、マウスの週齢に関しても、池田らの使ったマウスは生後26~28日齢であるが、本研究で使ったマウスは生後35~76日齢と幅が広く、かつ、時期も異なっており、この週齢の相違も表現型に影響を与えた可能性がある。一方、 ϵ 4-E2ホモ変異マウスに関しては、大きいオープンフィールドにおいて、

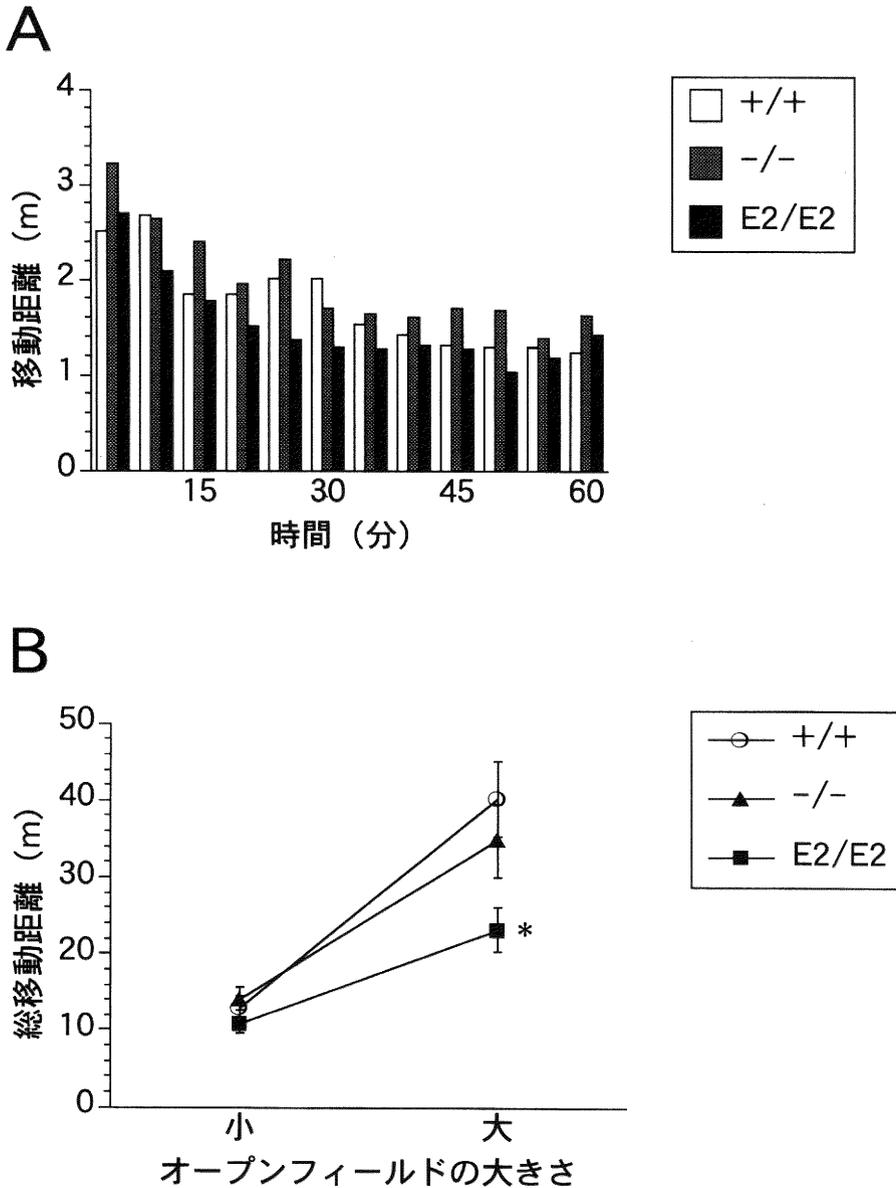


図3 $\epsilon 4$ -E2ホモ変異マウスの行動学的解析

- A. 時間経過に伴う自発的活動量の変化。生後27~28日齢の野生型 (+/+, 白, n=9), GluR $\epsilon 4$ 欠損 (-/-, 網, n=13) および $\epsilon 4$ -E2ホモ変異 (E2/E2, 黒, n=17) マウスの5分毎の移動距離を, オープンフィールド(小)を用いて60分間測定した。
- B. 大小2種類のオープンフィールドにおける自発的活動量。野生型 (+/+, 白丸, n=9), GluR $\epsilon 4$ 欠損 (-/-, 黒三角, n=13) および $\epsilon 4$ -E2ホモ変異 (E2/E2, 黒四角, n=17) マウスの30分間の総移動距離を, 小さい面積(小, 27.3 cm \times 27.3 cm) および大きい面積(大, 50 cm \times 50 cm) のオープンフィールドを用いて測定した。誤差線は標準偏差を表す。

$\epsilon 4-E2$ ホモ変異マウスの自発的活動量が, GluR $\epsilon 4$ 欠損マウスと野生型マウスのそれよりも低いことが示された。このことから, 生体における自発的活動性においては, GluR $\epsilon 2$ と GluR $\epsilon 4$ が別個の役割を担っている可能性のあることが示された。

それでは, $\epsilon 4-E2$ ホモ変異マウスと GluR $\epsilon 4$ 欠損マウスとの間の自発的活動量に有意差が認められたのはなぜだろうか。前述したように, ($\epsilon 4 E2/E2$) 個体における $\epsilon 4-E2$ 遺伝子 (外来性 GluR $\epsilon 2$) の発現量は, 野生型個体における内在性 GluR $\epsilon 2$ のその 5% 以下しかなかった。さらに, 本研究で作製された ($\epsilon 2-/-$, $\epsilon 4 E2/E2$) マウスもまた生後間もなく死亡し, 成体まで延命させることはできなかった。このことから, $\epsilon 4-E2$ ホモ変異マウスにおいて, GluR $\epsilon 2$ と GluR $\epsilon 4$ が共局在している部分では, $\epsilon 4-E2$ 遺伝子の効果はほとんどないと考えられる。そうだとすれば, $\epsilon 4-E2$ 遺伝子が生体に影響を及ぼす可能性が高いのは, GluR $\epsilon 4$ のみが発現している領域であると考えられる。その領域では, 量は少ないながらも, GluR $\epsilon 2$ が異所性の発現をしていることになる。内在性の GluR $\epsilon 4$ の発現がほとんどみられない成体の前脳に, GluR $\epsilon 4$ を過剰発現するトランスジェニックマウスでは, 海馬 CA1 領域における NMDA 電流の性状とシナプス可塑性に変化が認められた¹⁹⁾。この報告は, GluR ϵ サブユニットを異所性に発現させると, その領域の神経機能が攪乱される可能性があるということを示すものであり, ゆえに, GluR ϵ サブユニットの生理機能の多様性は, その分子的な機能の多様性に起因するということを示唆している。

本研究におけるこれらの結果から, GluR $\epsilon 2$ と GluR $\epsilon 4$ が生体において発現する機能は異なり, GluR $\epsilon 2$ は GluR $\epsilon 4$ の機能を代償することはできないことが示された。

謝 辞

本研究の遂行のために, 終始ご指導, ご助力いただきました新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野の崎村建司教授に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Bliss, T.V.P. and Collingridge, G.L.: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361**: 31~39, 1993.
- 2) Komuro, H. and Rakic, P.: Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, **260**: 95~97, 1993.
- 3) Schlagger, B.L., Fox, K. and O'Leary, D.D.M.: Postsynaptic control of plasticity in developing somatosensory cortex. *Nature*, **364**: 623~626, 1993.
- 4) Rabacchi, S., Bailly, Y., Delhay-Bouchaud, N. and Mariani, J.: Involvement of the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. *Science*, **256**: 1823~1825, 1992.
- 5) Yamazaki, M., Mori, H., Araki, K., Mori, K.J. and Mishina, M.: Cloning, expression and modulation of a mouse NMDA receptor subunit. *FEBS Lett.*, **300**: 39~45, 1992.
- 6) Meguro, H., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Kutsuwada, T., Yamazaki, M., Kumanishi, T., Arakawa, M., Sakimura, K. and Mishina, M.: Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature*, **357**: 70~74, 1992.
- 7) Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M. and Mishina, M.: Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature*, **358**: 36~41, 1992.
- 8) Ikeda, K., Nagasawa, M., Mori, H., Araki, K., Sakimura, K., Watanabe, M., Inoue, Y. and Mishina, M.: Cloning and expression of the $\epsilon 4$ subunit of the NMDA receptor channel. *FEBS Lett.*, **313**: 34~38, 1992.
- 9) Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S.: Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, **354**: 31~37, 1991.
- 10) Mishina, M., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Meguro, H., Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Ikeda, K., Nagasawa, M., Yamazaki, M., Masaki, H., Yamakura, T., Morita, T. and Sakimura, K.:

- Molecular and functional diversity of the NMDA receptor channel. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **707**: 136~152, 1993.
- 11) Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K. and Mishina, M.: Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport*, **3**: 1138~1140, 1992.
 - 12) Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., Yagi, T., Aizawa, S., Inoue, Y., Sugiyama, H. and Mishina, M.: Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor $\epsilon 1$ subunit. *Nature*, **373**: 151~155, 1995.
 - 13) Kiyama, Y., Manabe, T., Sakimura, K., Kawakami, F., Mori, H. and Mishina, M.: Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor $\epsilon 1$ subunit. *J. Neurosci.*, **18** (17): 6704~6712, 1998.
 - 14) Kutsuwada, T., Sakimura, K., Manabe, T., Takayama, C., Katakura, N., Kushiya, E., Natsume, R., Watanabe, M., Inoue, Y., Yagi, T., Aizawa, S., Arakawa, M., Takahashi, T., Nakamura, Y., Mori, H. and Mishina, M.: Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor $\epsilon 2$ subunit mutant mice. *Neuron*, **16**: 333~344, 1996.
 - 15) Kadotani, H., Hirano, T., Masugi, M., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M. and Nakanishi, S.: Motor discoordination results from combined gene disruption of the NMDA receptor NR 2 A and NR 2 C subunits, but not from single disruption of the NR 2 A or NR 2 C subunit. *J. Neurosci.*, **16** (24): 7859~7867, 1996.
 - 16) Ikeda, K., Araki, K., Takayama, C., Inoue, Y., Yagi, T., Aizawa, S. and Mishina, M.: Reduced spontaneous activity of mice defective in the $\epsilon 4$ subunit of the NMDA receptor channel. *Mol. Brain Res.*, **33**: 61~71, 1995.
 - 17) Yamakura, T., Mori, H., Shimojo, K. and Mishina, M.: Phosphorylation of the carboxyl-terminal domain of the $\zeta 1$ subunit is not responsible for potentiation by TPA of the NMDA receptor channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**: 1537~1544, 1993.
 - 18) Ghattas, I.R., Sanes, J.R. and Majors, J.E.: The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and in embryos. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 5848~5859, 1991.
 - 19) Okabe, S., Collin, C., Auerbach, J.M., Meiri, N., Bengzon, J., Kennedy, M.B., Segal, M. and McKay, R.D.G.: Hippocampal synaptic plasticity in mice overexpressing an embryonic subunit of the NMDA receptor. *J. Neurosci.*, **18** (11): 4177~4188, 1998.

(平成13年1月30日受付)