

哺乳動物の行動制御分子の同定と解析

Analysis of behavior control molecules in mammalian

研究代表者 岡崎国立共同研究機構生理学研究所助手 八木 健
National Institute for Physiological Sciences,
Takeshi YAGI

The mammalian brain constitutes an enormous neural network and regulates various behaviors. The question is how these neural networks are systematically formed during development and how they regulate behaviors. By producing several gene knocked-out mice which have abnormal behaviors, we confirmed that Fyn and subtypes of NMDA receptor regulated learning or emotional behaviors in mouse. In these, Fyn tyrosine kinase is extensively expressed in the central nervous system (CNS) of mammals, and its genetic disruption in mouse displays several behavioral abnormalities with morphological defects in the brain. To understand the signaling pathways in which Fyn is involved in the CNS, we screened molecules that directly associate with Fyn in mouse brain. We have identified 4 novel molecules; p130, CNR, FAP34, and FAP82. These molecules were concentrated in the mouse brain. Isolation of putative Fyn-binding molecules will open the field for understanding regulation of mammalian behavior at molecular level.

研究目的：ヒトを含む哺乳類脳は系統・個体発生過程で複雑化し、多様化している。しかし、この多様化した脳機能が生み出され、制御される分子機構は未だその本質が捉えられていない。我々は遺伝子欠損マウス作製系を独自に開発し、哺乳動物での脳機能を司る遺伝子の実体を明らかにしたいと考えた。その中で、薬理学実験により学習・記憶との関連性が示唆されているNMDA受容体、脳神経系で高い発現が認められている細胞内情報伝達分子である非レセプター型チロシンリン酸化酵素 Fynに注目し、それらの遺伝子欠損マウスの作製により、哺乳動物における脳機能制御分子の実体を明らかにすることを考えた。また、これらの遺伝子が脳機能発現過程においてどのような分子機能を担っているのかについて、結合分子を新たに単離・解析を試みた。これらの研究で得られた結果は、ヒトを含む哺乳動物の脳機能を制御する分子機構を明らかにするものであり、高次な脳機能を捉えて行く中での基礎となる。

研究経過：

NMDA受容体のサブタイプ及び非レセプター型チロシンリン酸化酵素 Fyn遺伝子欠損マウスの作製を行った結果、NMDA受容体欠損マウスではそのサブタイプにより脳機能異常の様式が異なっており、それぞれが脳機能発現に際して異なった機能を持っていることが明らかとなった。すなわち、e1サブタイプは海馬体での長期増強、

た。また驚いたことに、非レセプター型チロシリン酸化酵素の1つである Fyn を欠損させたマウスでは空間学習障害 (図 2)、情動異常、哺乳行動異常、海馬体形成異常となり、また、聴覚性痙攣発作になりやすい、NMDA に対するアゴニストにより痙攣を起こしやすいことが明らかとなった。この様に Fyn が哺乳動物での脳機能制御において重要な分子機能を担っていることが明らかとなったが、しかしその分子機能メカニズムについては殆ど明らかにされていない、よって我々は Fyn と脳神経系で共役している分子が哺乳類脳機能の制御において未知なる分子機能を担っていることを想定して、これらの分子の単離を試みた。

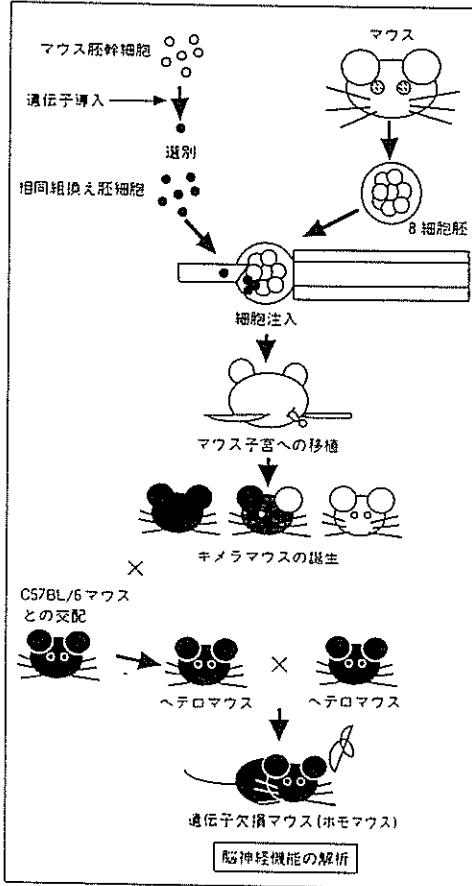


図 1 遺伝子欠損マウス作製の流れ
遺伝子導入はエレクトロポレーション法で行ない、ターゲティングベクターを導入する。薬剤耐性細胞を選別し、相同組換え体を選別する。

成果：

本研究により、遺伝子欠損マウスの作製により以下のことが明らかとなった。

- 1) e1 サブタイプは海馬体での長期増強、空間学習で機能している。
- 2) e2 サブタイプは神経回路形成過程、特に感覚神経における特異的な投射において機能している。
- 3) e4 サブタイプは自発行動発現に関与している。
- 4) δ2 サブタイプは小脳におけるシナプス形成に重要な機能を持ち、運動制御神経回路形成に重要である。
- 5) Fyn 欠損マウスでは聴覚性痙攣発作を起こしやすい。
- 6) Fyn 欠損マウスでは痙攣発作に関する薬理学的特徴があり、グルタミン酸、NMDA、GABA に関連した受容体に異常が認められる。

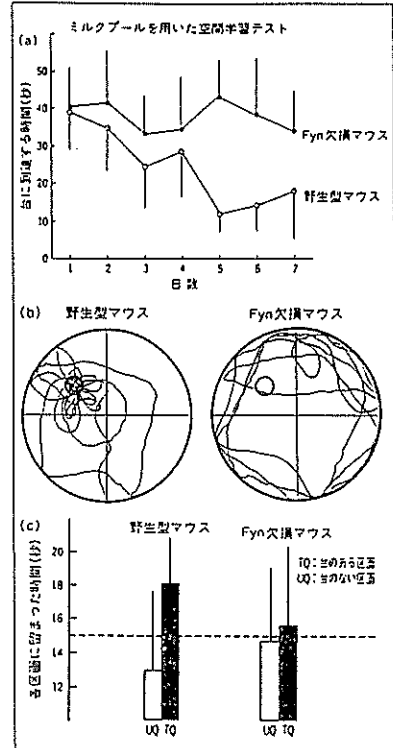


図 2 ミルクプールを用いた Fyn 欠損マウスの空間学習異常

(a) プールに1箇所水面から見えないように到達台を置き、その到達台に到達するまでの時間を毎日測定した。野生型マウスでは学習によりその時間が短縮するにもかかわらず Fyn 欠損マウスではほとんど短縮が認められなかった。(b) 学習を7日間行なったあとに到達台を取り除き、マウスを泳がせた軌跡を示す。学習している野生型マウスは到達台がないにもかかわらず、その場所に泳いでいく。(c) b のテストを到達台のある区画 (TQ) とない区画 (UQ) に分け、そこを泳いだ時間を計測した。野生型マウスでは台のある区画で泳いでいる時間が明らかに多いのに対して、Fyn 欠損マウスではほとんど変わらない。

7) Fynはシナプス肥厚に局在しており、NMDA受容体サブタイプ $\epsilon 1$ 及び $\epsilon 2$ をリン酸化している。

これらの結果により、NMDA受容体サブタイプやFynが実際に、哺乳動物での脳機能形成・制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、興味深いことにNMDA受容体サブタイプの $\epsilon 1$ 及び $\epsilon 2$ がFynにより直接リン酸化されていることが明らかとなり、これらの遺伝子欠損マウスの行動異常が空間学習障害、哺乳行動異常で共通していた。これらの結果は、脳形成・機能発現過程においてNMDA受容体とFynが密接な関係を持っていることを示す結果であり、今後の脳機能の分子機能を考える中で興味深い結果である。

また、本研究では脳機能を司る分子を新たに探索する目的で、Fynと結合する分子の探索を脳神経系について行った。その結果、新たにp130、CNR、FAP34、FAP82が得られた。これらの分子は脳で高発現していることが明らかとなっており、新たな哺乳動物の脳機能にどの様に関与する分子であるかについて解析を進めている。

今後の課題と発展：

現在、マウスを用いた遺伝子ターゲティング法の確立により脳形成・機能に遺伝情報がどの様に関与するかについて解析が進められている。これらの状況の中でこれまでに我々が明らかにしてきたFyn及びNMDA受容体が実際に脳形成・機能発現において重要な分子であることの証明は大きな意義をもつ。今後はこれらの事実を基礎として、実際に学習・記憶、情動などの脳機能がどの様な分子メカニズムにより構成され、機能しているかについて明らかにする必要がある。我々はこの中で、哺乳動物の脳神経系でFynと結合する分子を新たに4種得ており、今後これら分子の発現、機能解析を行い、遺伝子欠損マウス作製等ことにより脳形成及び機能発現での役割について解析して行きたいと考えている。新たな脳機能を制御する分子が明らかになるにより、現在までに脳機能を考えてゆく上で行われていた薬理的、電気生理学的解析とは異なる新たな解析ベクトルがもたらされるのではないかと確信している。ヒトの脳を頂点とする高次な脳機能は進化の過程で多様化・高次化してきた。遺伝情報からの脳機能解析はヒトの高次な脳機能がいかに生じたかについての実体を分子レベルで検証する立場を与えることであり、現在まであいまいにされてきたヒトの脳機能の解明について新たな解析の方向性をもたらして行くものであると確信している。

発表論文

- 1) Miyakawa, T., Yagi, T., Tateishi, K., and Niki, H.
Susceptibility to drug-induced seizures of Fyn tyrosine kinase deficient mice.
NeuroReports 1996 in press.
- 2) Abe, S., Yagi, T., Ishiyama, S., Hiroe, M., Marumo, F., and Ikawa, Y.
Molecular cloning of a novel serine/threonine kinase, MRK, possibly involved in cardiac development. *Oncogene* 11 2187-2195 1996.
- 3) Yasunaga, M., Yagi, T., Hanzawa, N., Yasuda, M., Yamanashi, Y., Yamamoto, T., Aizawa, S., and Nishikawa, S. Involvement of Fyn tyrosine

kinase in progression of cytokinesis of B lymphocyte progenitor.

J Cell Biol 132 91-99.

- 4) Tezuka, T., Umemori, H., Fusaki, N., Yagi, T., Takata, M., Kurosaki, T., and Yamamoto, T. Physical and functional association of the cbl proto-oncogene product with a Src-family protein tyrosine kinase, p53/56lyn, in the B cell antigen receptor-mediated signalling. *J Exp Med* 183 675-680 1996.
- 5) 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.
- 6) Miyakawa, T., Yagi, T., Kagiya, A., and Niki, H. Radial maze performance, open-field and elevated plus-maze behaviors in Fyn-kinase deficient mice: Further evidence for increased fearfulness. *Mol Brain Res* 37 145-150 1996.
- 7) Watanabe, S., Kai, N., Yasuda, Y., Kohmura, N., Sanbo, M., Mishina, M., and Yagi, T. Stable production of mutant mice from double gene converted ES cells with puromycin and neomycin. *Biochem Biophys Res Commun* 213 130-137 1995.
- 8) Ikeda, K., Araki, K., Takayama, Ch., 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.
- 9) Yoshida, M., Yagi, T., Furuta, Y., Takayanagi, K., Kominami, R., Takeda, N., Tokunaga, T., Chiba, J., Ikawa, Y., and Aizawa, S. Use of a new strategy to identify clones trapping genes that are not expressed in ES cells. *Transgenic Res* 4 277-287 1995.
- 10) Kashiwabuchi, N., Ikeda, K., Araki, K., Hirano, T., Shibuki, K., Takayama, Ch., Inoue, Y., Kutsuwada, T., Yagi, T., Kang, Y., Aizawa, S., and Mishina, M. Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR $\delta 2$ mutant mice. *Cell* 81 245-252 1995.
- 11) Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, Ch., 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.
- 12) Yagi, T. Gene targeting of fyn tyrosine kinase in murine nervous system. *Genes for development, cell growth and infectious diseases* John Libbey Eurotext, Paris pp17-27 1995.
- 13) Miyakawa, T., Yagi, T., Taniguchi, M., Matsuura, H., Tateishi, K., and Niki, H. Enhanced susceptibility of audiogenic seizures in Fyn-kinase deficient mice. *Mol Brain Res* 28 349-352 1995.