

氏 名	やまもと むつ や 山 本 睦 也
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	論 医 博 第 1840 号
学位授与の日付	平 成 15 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells <i>in vivo</i> by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain. (破傷風菌神経毒素軽鎖タンパク質を発現させることによる、マウス <i>in vivo</i> での、小脳顆粒細胞グルタミン酸神経伝達の可逆的な制御方法に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 大 森 治 紀 教 授 金 子 武 嗣 教 授 中 西 重 忠

論 文 内 容 の 要 旨

脳神経系において、情報の処理や統合がどのようなメカニズムで行われているかを理解する際に、神経回路中の特定の神経細胞機能を不活性化させる研究手法は極めて有用である。哺乳動物においては、遺伝子工学的技術を用いて、特定の神経細胞を細胞死によって神経回路から永久除去させる手法が開発されている。この方法は、神経の発生、情報の処理や統合メカニズムの研究で大きな成果をおさめてきたものの、同時に適応・代償といった神経の可塑的な変化を引き起こすものでもあった。よって、*in vivo*で可逆的に神経細胞の機能を制御する技術は強く必要とされる方法論であり、本研究において、その方法論の開発と、それを利用した神経機能の解析を行うこととした。

まず、Tetマウス、TeNTマウスと名付けた2種類のトランスジェニックマウスを作製した。Tetマウスでは、逆テトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (rtTA) が、GABA_A受容体 $\alpha 6$ サブユニット遺伝子のプロモーター機能の働きで小脳顆粒細胞に限局して発現する。一方、TeNTマウスには、テトラサイクリン応答プロモーターが有り、その支配下に、N 末側に緑色蛍光タンパク質 (EGFP)、C 末側にマウスオルニチンデカルボキシラーゼ由来 PEST ドメインを付加させた破傷風菌神経毒素軽鎖 (TeNT) の融合タンパク質 (EGFP/TeNT) 遺伝子が配置されている。従って、TetマウスとTeNTマウスを交配して得られる Tet/TeNT ダブルトランスジェニックマウスでは、テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン (DOX) を経口投与、或いは投与休止することで、それぞれ rtTA が活性化、非活性化され、EGFP/TeNT の発現をオン、オフ制御することができる。

Tet/TeNTマウスはDOX投与後でも正常に成育した。EGFP/TeNTの誘導発現は、DOX投与後5日目には最大に達し、投与継続期間その発現レベルが持続された。その後投与を休止すると、DOXが体内から除去される結果、3週間でEGFP/TeNTの発現も検出されなくなった。次に脳での発現部位・細胞を特定したところ、EGFP/TeNTは、小脳顆粒細胞の細胞体、およびその軸索である平行繊維に特異的に存在することが示された。また、EGFP/TeNTの発現誘導に伴い、TeNTのプロテアーゼ基質であるシナプス小胞タンパク質 (VAMP2/Synaptobrevin2) が切断され、高カリウム刺激による顆粒細胞からの神経伝達物質グルタミン酸の放出が減少することも観察された。このVAMP2/Synaptobrevin2の切断とグルタミン酸の放出減少は、DOX投与を休止することで回復した。更に、野生型、Tet、TeNT、Tet/TeNTの4種の遺伝子型マウスについて、fixed barとrota-rodの行動試験を行い、EGFP/TeNTの小脳顆粒細胞での発現がマウス個体の協調運動機能にどのような影響を及ぼすかを調べた。その結果、Tet/TeNTマウスにおいてのみ、DOX投与依存で可逆的な協調運動機能の失調が観察された。

以上より、本研究において作製したTet/TeNTトランスジェニックマウスでは、DOX投与、投与休止によって、小脳顆粒細胞選択的にそのグルタミン酸神経伝達を可逆的に制御することが可能であり、協調運動や学習の際に果たす小脳の役割を解析する上で、このマウスが極めて有効な実験系を提供することが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は遺伝子工学的手法を用い、マウス *in vivo* で特定の神経細胞のグルタミン酸神経伝達を可逆的に抑制する方法を開発したものである。申請者は、GABA_A受容体 $\alpha 6$ サブユニット遺伝子のプロモーター機能によりテトラサイクリン制御性活性化因子 (rtTA) が、小脳顆粒細胞に限局して発現する Tet マウスと一方破傷風菌神経毒素蛋白質 (TeNT) をテトラサイクリン応答配列の制御下に配置した導入遺伝子を持つ TeNT マウスを作製した。Tet マウスと TeNT マウスを交配して得た Tet/TeNT 二重遺伝子導入マウスでは、ドキシサイクリン (DOX) 投与依存的に、破傷風毒素の発現が小脳顆粒細胞特異的に誘導され、この発現に伴い (1) シナプス小胞からの伝達物質の分泌に必須の蛋白質 VAMP2 が切断され、(2) 顆粒細胞からのグルタミン酸放出が減少し、(3) マウスの協調運動機能が障害されることを示した。更に、DOX 投与を休止すると、破傷風毒素が消失し、VAMP2 の発現、グルタミン酸の放出及び運動機能のいずれもが可逆的に回復した。

以上の研究は運動制御における小脳のグルタミン酸神経伝達系の役割を明らかにするとともに、神経伝達を *in vivo* で可逆的に制御する新しい方法論を確立したものであり、神経回路機能の解明に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年9月26日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。