九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

ノックアウトマウス―その特性と応用-(1) : NMDA受容体 サブユニットノックアウトマウス

伊藤, 功
九州大学理学部生物学教室生体物理化学講座

https://hdl.handle.net/2324/18825

出版情報：日本神経精神薬理学雑誌. 17 (5), pp.185-192, 1997-05. Japanese Society of Neuropsychopharmacology
バージョン：
権利関係：

〔総　説〕

ノックアウトマウス—その特性と応用—（1）：NMDA受容体サブユニットノックアウトマウス

伊　藤　　功*

* 九州大学理学部生物学教室生体物理化学講座

（1997年11月11日受理）

要約：ジーンターゲティング法により特定の遺伝子の発現が抑制されたマウスを作製することが可能となった．このようなマウスをノックアウトマウスと呼んでいる．ノックアウトマウスを利用することにより，様々な蛋白質の生体内における機能を解析する新しい手法が提供された．近年，実に様々なノックアウトマウスが作製されているが，その一つにNMDA型グルタミン酸受容体（NMDA受容体）のサブユニットをコードする遺伝子に欠損をもつNMDA受容体サブユニットノックアウトマウスがある．NMDA受容体は中枢神経系の様々な生理的，病理的現象との関連が指摘されている重要な受容体である．また近年この受容体のサブユニットをコードするいくつかの遺伝子がクローニングされ，NMDA受容体の多様性が認識されるにともない，中枢神経シナプスにおいて機能しているNMDA受容体のサブユニット構造や，NMDA受容体の多様性の生理的意義についての関心が高まってきた．このような背景のもと，ここ数年，次々にNMDA受容体サブユニットをノックアウトしたマウスが作製され，これらを用いた研究の成果が蓄積されつつある．この間行われた解析も，生理学的，組織化学的分析から行動科学的観察まで，実に多様である．本稿ではNMDA受容体や可塑性研究においてノックアウトマウスが果たしつつある役割と問題点などを概説する．

キーワード：NMDA受容体，ノックアウトマウス，シナプス，可塑性

1990年代半ば以降，NMDA受容体のサブユニットをジーンターゲティング法によりノックアウトしたマウスが作製され，様々な報告がなされている．我々もそれらを用いて，主としてNMDA受容体とNMDA受容体が関与するシナプスの可塑性について，生理学的解析を行ってきた．NMDA受容体が様々な生理機能を担っていると考えられるために，ノックアウトマウスに寄せる期待もまた各分野で様々であろうが，本稿では主として，NMDA受容体と可塑性研究（主として海馬の長期増強）の分野から，そのようなアプローチがなぜ必要とされ，それによって何が明らかになり，何が未解明であるのか．また，それはなぜか．それらのことを反省も含めて述べてみたい．そのためにまず，ノックアウトマウスが登場する以前のNMDA受容体および可塑性研究の状況を，簡単に振り返ることからはじめようと思う．また，ノックアウト動物の作製法や，ノックアウト動物を用いる場合の一般的な注意事項などに関しては他書を参照されたい．

ノックアウトマウスへの期待（レセプター，可塑性研究の立場から）

1. NMDA受容体研究の状況

中枢神経系における主要な神経伝達物質であるグルタミン酸を受容し，神経伝達を司るグルタミン酸受容体には大別して二つのカテゴリーが存在する．これらはイオンチャネル型（ionotropic type）グルタミン酸受容体と代謝調節型（metabotropic type）グルタミン酸受容体と呼ばれている．NMDA受容体は，イオンチャネル型グルタミン酸受容体の1種であり，分子内にリガンド結合部とイオンチャネル部位とをもち，受容体-イオンチャネル複合体として機能している．NMDA受容体にはN-methyl-D-aspartate（NMDA）が特異的アゴニストとして，またD-2-amino-5-phosphonovaleric acid（D-AP5）が特異的かつ拮抗的なアンタゴニストとして作用することが知られ，これら特異的作用薬の存在が，NMDA受容体の研究を進歩させ，その際だった特徴を明らかにするために役立ってきた．

NMDA受容体には機能的に三つの特徴がある．第一は，膜電位依存性のMg^{2+}による阻害作用である．この阻害効果はμMの濃度からみられるため，生理的条件下，静止膜電位付近ではNMDA受容体チャネルはアゴニストが存在しても通常活性化されないが，膜電位が脱分極することによりこの阻害が解除され，チャネルは開くようになると考えられている．第二は，この受容体チャネルが一価カチオン（Na^+, K^+）以外に，二価カチオンであるCa^{2+}をよく通す性質をもっていることである．Ca^{2+}はセカンドメッセンジャーとして細胞内で様々な酵素系を制御しうるため，この性質は，シナプスの可塑的性質との関連においてきわめ

* 〒812-81 福岡市東区箱崎6-10-1
（別刷請求先：伊藤　功）

略語　**D-AP5**：D-2-amino-5-phosphonovaleric acid, **LTD**：long-term depression（長期抑制），**LTP**：long-term potentiation（長期増強），**NMDA**：N-methyl-D-aspartate（N-メチル-D-アスパラギン酸）

Table 1 Subunit families of rodent NMDA receptor channels

Subfamily	Subunit	
	Rat	Mouse
NR2/GluRε	NR2A, NR2B, NR2C, NR2D	ε1, ε2, ε3, ε4
NR1/GluRζ	NMDAR1	ζ1

て重要であると考えられている．第三は，この受容体がアロステリック部位としてグリシン結合部位をもち，グリシンにより受容体応答が増強されることである．これらの事実は，NMDA 受容体の遺伝子がクローニングされる以前から生理学的・薬理学的解析により明らかにされていたことである（Ascher and Nowak, 1987）．

NMDA 受容体の遺伝子がクローニングされた結果，この受容体には NMDAR1（または ζ1）および，4 種類の NR2（A-D，または ε1-4）と呼ばれるサブユニットが存在することが明らかになった（Table 1）．様々な発現系を用いて各サブユニットの機能が解析された結果，ζ1 サブユニットは受容体の骨格を構成する必須のサブユニットであり，それ自身で homomeric な受容体チャネルを構成しうる．また，ε サブユニットは homomeric な受容体チャネルを構成しえないが，ζ1 サブユニットと同時に発現させることによって高い活性をもつ受容体が構成される．4 種類の ε サブユニット（ε1-4）には固有の脳内分布がみられ，発現する時期も異なる（Watanabe et al, 1992, 1993）．また各 ε サブユニットと ζ1 サブユニットとを組み合わせて発現させその特性が検討された結果，ε サブユニットを異にする受容体では，そのアゴニスト，アンタゴニストに対する親和性，Mg^{2+} 感受性，チャネルの gating 特性，kinase による制御等に違いがみられることが明らかになった．また，ζ1 および ε サブユニットの第 2 膜貫通領域（M2）に存在するアスパラギン残基をグルタミンに置換することにより，NMDA 受容体チャネルの膜電位依存性の Mg^{2+} による阻害や，Ca^{2+} 透過性が大きく変化すること等も明らかになった（三品，1993；Seeburg, 1993；Mori and Mishina, 1995）．

これらの知見に基づき，シナプス下で機能している受容体は，ζ1 サブユニットと ε サブユニットとを含む heteromeric な分子であり，かつ NMDA 受容体は脳内の部位により，また発生時期によりサブユニット構造が異なるのではないかと考えられるようになった．しかし，*in vivo* においてシナプス直下で実際に機能している NMDA 受容体のサブユニット構造に関しては，明らかでなかった．また，多様な NMDA 受容体が存在することの生理的意義も十分に理解されてはいなかった．

2. 可塑性研究の状況

脳神経シナプスの可塑的性質の一つである長期増強（long-term potentiation, LTP）には NMDA 受容体依存性の LTP と NMDA 受容体非依存性の LTP が知られている．本稿では，海馬における NMDA 受容体依存性の LTP に限って，ノックアウトマウスが登場する以前の研究の状況を簡単に振り返ることにする．詳しくは，他の総説を参照されたい（Bliss and Collingridge, 1993）．

LTP はシナプス伝達が長期間にわたり増強される現象である．したがって，LTP を理解するということは，①伝達物質の放出機構が変化するのか（すなわちプレシナプティックな変化によるのか），あるいは受容体の数や性質が変化するのか（すなわちポストシナプティックな変化によるのか），②それはどのようなメカニズムにより引き起こされるのか，という二つの問いに答えねばならない．まず，プレかポストかの問題については，90 年代に入り主として量子解析による検討が数多くなされたが，明確な結論を得るには至っていなかったといってよいであろう．中枢神経系における量子解析では，原理的，実験的制約から，解析結果に疑問が残されていたように思われるとともに，プレおよびポストの変化を示唆する報告がともに提出され，結果的に両方とも変化していると考えざるをえなかった．次にシナプス前終末からの放出量の変化を引き起こすメカニズムに関しては，アラキドン酸や一酸化窒素（NO）等が逆行性伝達物質として作用しているのではないかとの仮説が提案され，これら逆行性伝達物質の作用により誘起される可能性がある細胞内機構も検討されたが，確証を得るには至っていなかったように思われる．一方，シナプス後細胞内で起こりえる変化については，レセプターとしての NMDA 受容体の研究の進歩に基づき，次のようなモデルが提案されていた．

生理的条件下，NMDA 受容体は膜電位依存性 Mg^{2+} ブロックにより抑制されているため通常のシナプス伝達は non-NMDA 受容体を介して行われている．ところが，LTP を誘導しうるような高頻度刺激を受けると，non-NMDA 受容体を介する EPSP が加重されシナプス後細胞が強く脱分極される．すると NMDA 受容体の Mg^{2+} ブロックが解除され，伝達物質であるグルタミン酸の作用を受けて NMDA 受容体が活性化されるようになる．NMDA チャネルは Ca^{2+} に対して透過性をもつため，NMDA 受容体の活性化にともないシナプス後細胞に Ca^{2+} が流入する．シナプス後細胞の遊離 Ca^{2+} 濃度の上昇は Ca^{2+} 依存性のリン酸化酵素系等を活性化し，non-NMDA 受容体がリン酸化されることによりシナプス応答が増強される，というものである．

この解釈は，確かにいくつかの実験的根拠を有すると同時に，LTP の三つの特徴である，入力特異性，協力性および Ca^{2+} 依存性をうまく説明できる．しかし，近年サイレントシナプスの発見により，機能しうるシナプスないしは受容体の数の変化が起こる可能性も考慮せざるをえなくなっ

ている（Liao et al, 1995 ; Isaac et al, 1995）．さらに当然，この説のようにシナプス後細胞に全てのメカニズムを帰結することに対する反論もあった．また，NMDA 受容体のクローニングの成果から，それまでの“AP5 感受性の NMDA 受容体”といったマクロな概念から，NMDA 受容体には脳内の部位により，また発生段階により，多様性があるのではないかとの考えが受け入れられるようになったことから，いわゆる NMDA 受容体依存性の LTP にも，関与している NMDA 受容体の構造的差異や細胞内反応機構の違い等，多様性がありうるのではないかと考えられるようになってきた．

以上，90 年代前半の NMDA 受容体の研究と NMDA 受容体が関与する LTP の研究を簡単に振り返って，それらがともに共通の問題意識をもつようになっていたことに気付く．それは，

① 個々のシナプスにおいて実際に機能している NMDA 受容体のサブユニット構造を知ること．

② NMDA 受容体の多様性の生理的意義を明らかにすること．

である．そして，これらの問題を解明するための手段の一つとして期待されたのがノックアウトマウスであったように思われる．

NMDA 受容体サブユニットノックアウトマウスの登場

通常の NMDA 受容体サブユニットノックアウトマウスは，Neomycin phosphotransferase の遺伝子を標的遺伝子のエクソンに挿入する方法で作製され，これにより標的遺伝子の正常な発現を阻止しようとするものである．この方法で作製された NMDA 受容体サブユニットのノックアウトマウスでは，その標的遺伝子が発生初期から発現されているサブユニットである場合（たとえば，ζ1 および ε2 サブユニット，Fig. 1），それを完全にノックアウトする（両方の染色体が変異遺伝子となっているホモ接合型，homozygote, −/−）と致死的影響が出る．しかし，生後遅れて発現してくるサブユニット（たとえば，ε1 および ε3 サブユニット，Fig. 1）をノックアウトした個体の場合には，見かけ上，異常はみられない．これは，ある種の NMDA 受容体がシナプス形成において重要な役割を果たしていることを示唆するものであろう．また，あるサブユニットをノックアウトすると，本来は発現されていない他のサブユニットが発現されてきたり，または発現されている他のサブユニットの発現量が変化することによってノックアウトされたサブユニットの機能を補うことが知られている（=compensation）が，今までに観察されている NMDA 受容体サブユニットのノックアウトマウスでは，少なくともマクロなレベルでは，起こらないように思われる．しかし個々の細胞やシナプスのようなミクロなレベルでは可能性を完全には否定できないかもしれない．以下，各ノックアウトマウスに関する報告を簡単に要約するが，詳しくは原報をご覧いただきたい．

1. ζ1（NMDAR-1）ノックアウトマウス

ζ1 サブユニットは NMDA 受容体に必須のサブユニットであると考えられ，かつ胎生期から成熟個体まで脳内に広く発現しているサブユニットである（Fig. 1）．したがって，このサブユニットをノックアウトすることは，全ての NMDA 受容体を全発生過程を通じて消失させることになり，その影響は重大であると予想される．事実，ζ1 ノックアウトマウスは生後 10〜20 時間後には死亡した．死亡原因は哺乳反射に障害があり，ミルクが飲めないことによる脱水や呼吸障害が直接原因と考えられている．したがって解析は，出生直後の動物を用いるか，ノックアウトマウスの脳から採取した神経細胞を培養細胞系に移して行われている．その結果，ζ1 ノックアウトマウス由来の小脳顆粒細胞および，海馬錐体細胞の培養系では，NMDA 受容体応答ならびに，NMDA 受容体を介する細胞内カルシウムの増大が阻害されていた．また，Forrest らは ζ1 ノックアウトマウスでは ε2 サブユニットの発現量が減少していたと報告している（Forrest et al, 1994）．さらに，ζ1 ノックアウトマウスでは，顔面洞毛（口髭）からの感覚刺激を伝える一次求心性線維を受けて，脳幹三叉神経核に現れるバレル構造（barrelette）が形成されないことが明らかになった．三叉神経核ニューロンの興奮性，および抑制性のシナプス入力は正常であったが，NMDA 応答は観察されなかったことから，バレル構造の形成には NMDA 受容体の活性化が必要ではないかと報告されている（Li et al, 1994）．

2. ε1（NR2A）ノックアウトマウス

ε1 サブユニットは胎生期には発現がみられず，生後脳全体に発現してくるサブユニットである（Fig. 1）．したがって，ε1 サブユニットのノックアウトは初期発生には重大な影響を及ぼさないであろうと予想される．事実，ε1 ノックアウトマウスは正常に出産され，発育し，繁殖も正常に行われ，光顕レベルの観察では脳全体として異常はみられない．また，ε1 ノックアウトマウスでは海馬 CA1 野の non-NMDA 受容体を介するシナプス伝達は影響を受けないが，CA1 シナプスの NMDA 受容体応答および LTP が減少し，水迷路課題で評価した動物の空間学習能も低下していた（Sakimura et al, 1995 ; Ito et al, 1996）．（下記 ε3 ノックアウトマウスの項に関連事項）

3. ε2（NR2B）ノックアウトマウス

ε2 サブユニットは発生初期から脳全体に発現がみられ，生後前脳に発現が限極されてくるサブユニットである（Fig. 1）．ε2 ノックアウトマウスは ζ1 ノックアウトマウスと同様，哺乳反射に障害があり，ミルクが飲めないため生後数時間で死亡する．しかし，数日間であれば，人がミ

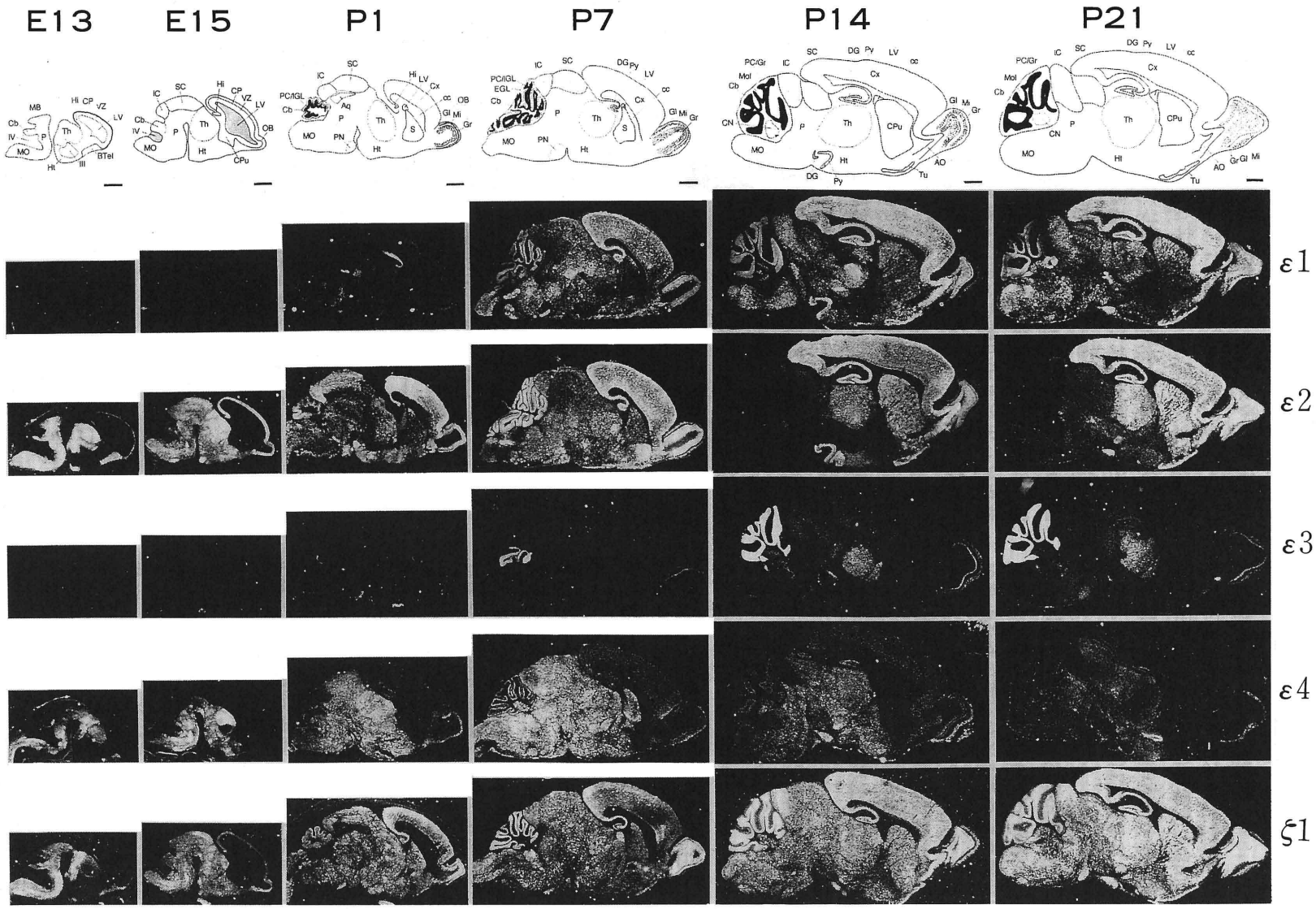

Fig. 1 Developmental changes in distribution of the five NMDA receptor subunit mRNAs. Parasagittal sections of the mouse brain at embryonic day 13 (E13), E15, postnatal day 1 (P1), P7, P14 and P21 were hybridized with radiolabeled oligonucleotide probes specific for the ε1, ε2, ε3, ε4 or ζ1 subunit mRNA. Sections are shown schematically in the top row. Abbreviations: AO, anterior olfactory nucleus; Aq, cerebral aqueduct; BTel, basal telencephalon; Cb, cerebellum; cc, corpus callosum; CN, cerebellar nuclei; CP, cortical plate; CPu, caudate-putamen; Cx, cerebral cortex; DG, dentate gyrus; EGL, external granular layer; Gl, olfactory glomerular layer; Gr, olfactory granular layer; Hi, hippocampus; Ht, hypothalamus; IC, inferior colliculus; IZ, intermediate zone; LV, lateral ventricle; MB, midbrain; Mi, olfactory mitral cell layer; Mol, cerebellar molecular layer; MO, medulla oblongata; OB, olfactory bulb; P, pons; PC/Gr, Purkinje cell layer/granule cell layer; PC/IGL, Purkinje cell layer/internal granular layer; PN, pontine nuclei; Py, hippocampal pyramidal cell layer; S, septum; SC, superior colliculus; Th, thalamus; Tu, olfactory tubercle; VZ, ventricular zone; III, the third ventricle; IV, the forth ventricle. Scale bars, 1 mm. (From Watanabe et al, 1992)

ルクを与えて生存させることは可能である．ε2 ノックアウトマウスは ζ1 ノックアウトマウスと同様，脳幹三叉神経核に現れるバレル構造が形成されず，顔面から三叉神経核に投射する一次求心性線維の終末のクラスタリングも認められなかった．また，海馬 CA1 シナプスの NMDA 受容体応答ならびに長期抑制（long-term depression, LTD）が消失したことが報告されている（Kutsuwada et al, 1996）．

4. ε3（NR2C）ノックアウトマウス

ε3 サブユニットは胎生期には発現されず，生後遅れて主として小脳の顆粒細胞に発現されるサブユニットである（Fig. 1）．小脳の顆粒細胞には胎生期から ε2 サブユニットが発現しているが，ε2 サブユニットは生後減少し，約 3 週間後にはほとんど検出されなくなる．生後は，ε1 サブユニットの発現がただちに始まり，これより遅れて ε3 サブユニットの発現が始まる（Watanabe et al, 1992, 1993）（Fig. 1）．ε3 ノックアウトマウスは正常に発育し，繁殖も行われ，行動にも異常はみられない．顆粒細胞における NMDA 受容体応答の電気生理学的解析により，ε3 ノックアウトマウスでは，小さなコンダクタンスをもつ NMDA 受容体チャネルが消失し，大きなコンダクタンスをもつ NMDA 受容体チャネルが観察された．また，ε3 サブユニットのノックアウトにより，mossy fiber-顆粒細胞シナプスの NMDA 受容体応答が増大した．これは，顆粒細胞内で ε1 サブユニットと ε3 サブユニットが ζ1 サブユニットを取り合っているためではないかと考えられている．また，ε3 ノックアウトマウスでは mossy fiber-顆粒細胞シナプスの non-NMDA 受容体応答が減少していた．この事実は，ε3 サブユニットがなんらかの機構で non-NMDA 受容体の発現に影響している可能性を示すものであるかもしれない（Ebralidze et al, 1996）．

一方，高橋らは ε1 サブユニットのノックアウトマウスを用いて，小脳の顆粒細胞および mossy fiber-顆粒細胞シナプスの NMDA 受容体の電気生理学的解析を行っている．ε1 ノックアウトマウスでは生後早い時期には大きなコンダクタンスをもつ NMDA 受容体が発現しており，生後約 3 週間以降になると小さなコンダクタンスをもつ NMDA 受容体に変化していく．これに伴い mossy fiber-顆粒細胞シナプスにおける NMDA 受容体応答の減衰速度が野性型マウスでは速くなり，ε1 ノックアウトマウスでは遅くなるとともに，mossy fiber-顆粒細胞シナプスにおける NMDA 受容体応答の膜電位依存性の Mg^{2+} ブロックが，生後日数の増加とともに軽減した．これらの事実は，小脳の顆粒細胞における ε サブユニットの経時的発現パターンとよく一致していた（Fig. 1）（Takahashi et al, 1996）．

また，ε1 サブユニットと ε3 サブユニットのダブルノックアウトマウスも作製されており，このマウスは正常に発育し，小脳を含む脳全体に異常はみられないが，生後 20 日の時点では，mossy fiber-顆粒細胞シナプスにおける NMDA 受容体応答がほぼ完全に消失していた．しかし，通常の行動に特別異常はみられず，比較的遅く（20 rpm）回転するロッドにはとどまることができるが，25 rpm で回転するロッドにはとどまることができず，回転ロッドにとどまる訓練においても訓練効果は劣っていた（Kadotani et al, 1996）．

5. ε4（NR2D）ノックアウトマウス

ε4 サブユニットは胎児期から，間脳（diencephalon）と脳幹に発現され，生後急速に減少するサブユニットである（Fig. 1）．ε4 ノックアウトマウスは，正常に発育し，繁殖も行われ，その脳にも解剖学的異常はみられない．また，ε2 ノックアウトマウスにみられたような，脳幹三叉神経核バレル構造の異常もみられなかった．しかし，オープンフィールドテストにおいて，自発的行動に有意な減少が観察されている（Ikeda et al, 1995）．その他，電気生理学的解析は，まだ行われていない．

以上のような各 NMDA 受容体サブユニットのノックアウトマウスに関する報告から感ずるのは，ノックアウトマウスを用いて行われた解析が，まだ質，量ともに十分でないことである．これまでにノックアウトマウスを用いて報告された結果には，ノックアウトマウスが導入される以前から生理学的，薬理学的または組織化学的解析により推察されていた事柄を，ノックアウトマウスを用いることで確認された事例が多く含まれている．もちろん，ノックアウトマウスが作製されて日が浅いこともあり，今後，解析が進んでいくことが期待されるが，ここで，本稿の初めに提案した二つの問題に対して，ノックアウトマウスがどのように適用され，それは有効であったかどうか考えてみたい．

シナプスにおいて実際に機能している NMDA 受容体のサブユニット構造は明らかになったか？

我々は海馬 CA1 野の Shaffer/commissural-CA1 シナプスの NMDA 受容体応答ならびに LTP に対する ε1 サブユニットのノックアウト効果を解析した．その結果，ε1 ノックアウトマウスではこのシナプスの NMDA 受容体応答および LTP が半分以下にまで抑制された．残存する NMDA 受容体成分はおそらく ε2 サブユニットを構成因子とする NMDA 受容体によるものであろう（Sakimura et al, 1995 ; Ito et al, 1996）．しかしこの結果から，Shaffer/commissural-CA1 シナプスにおいて機能している NMDA 受容体のサブユニット構造を推定することは不可能であった．なぜなら，観察された結果は，ε1 サブユニットを欠損させたことによる，全 NMDA 受容体数の減少によるものなのか，あるいは ε1 サブユニットを欠損させたことで機能不全となった NMDA 受容体が残存していたことによる

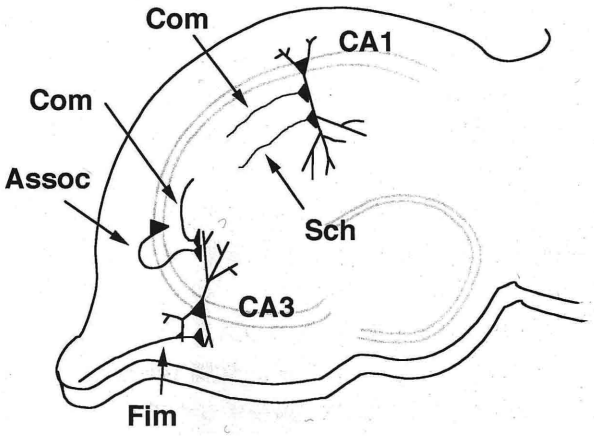

Fig. 2 Schematic diagram of the main excitatory inputs of the hippocampal CA1 and CA3 pyramidal neurons. Abbreviations: Assoc; Associational fibers, Com; Commissural fibers, Fim; Fimbrial fibers, Sch; Schaffer collaterals

ものであるのかを区別できない．さらに，このシナプスは，同側海馬 CA3 錐体細胞からの Shaffer 側副枝と，反対側海馬 CA3 錐体細胞からの commissural fiber とが，CA1 錐体細胞の頂上樹状突起に形成しているシナプスである（Fig. 2）．したがって，各入力に対して異なる ε サブユニットを構成因子とする受容体が存在することも考えられ，このような場合には，どちらか一方の入力系の NMDA 受容体応答のみが抑制されている可能性も考えられるが，CA1 野放線層（stratum radiatum）において電気刺激を行う限り，これら二つの入力系を選択的に活性化することはできない．そこで我々は，シナプスにおいて実際に機能している NMDA 受容体のサブユニット構造を明らかにするためには，単一の入力系を選択的に活性化することが可能なシナプスに対して，ノックアウト効果を解析する必要があると考えた．

海馬 CA3 錐体細胞はその basal dendrite に fimbrial fiber を，またその apical dendrite に commissural/associational fiber を入力として受けている．したがって CA3 野放線層（stratum radiatum）のシナプスは二つの入力を含むことになるが，CA3 野多形細胞層（stratum oriens）のシナプスは，単一の入力系からなるシナプスであると考えられた（Fig. 2）．そこで我々は，海馬 CA3 錐体細胞のこれら二つのシナプス（commissural/associational(C/A)-CA3 シナプス，および fimbria(Fim)-CA3 シナプス）の NMDA 受容体応答および LTP に対する，NMDA 受容体 ε1 および ε2 サブユニットのノックアウト効果を比較解析した（Ito et al, 1997）．その結果，ε1 サブユニットのノックアウトにより，C/A-CA3 シナプスの NMDA 受容体応答および LTP は強く抑制されるのに対して，Fim-CA3 シナプスのこれらの機能は，ほとんど影響を受けなかった．一方，ε2 サブユニットノックアウトマウス（heterozygote（+/−）を使用）では，Fim-CA3 シナプスの NMDA 受容体応答および LTP は強く抑制されるのに対して，C/A-CA3 シナプスのこれらの機能はほとんど影響を受けないことが明らかになった．これらの結果は，Fim-CA3 シナプスにおいて機能している主要な NMDA 受容体は ε2 サブユニットを構成因子とするものであり，C/A-CA3 シナプスにおいて機能している主要な NMDA 受容体は ε1 サブユニットを構成因子としている可能性を示唆している．またこれらの事実は，CA3 錐体細胞では，細胞の極性ないしは入力に依存して，ε サブユニットが単一細胞内で不均一に配分される可能性を示唆している．

小脳の mossy fiber-顆粒細胞シナプスにおける NMDA 受容体のサブユニット構造は，Ebralidze らおよび高橋らのグループによって，ある程度明らかになってきたように思われる（Ebralidze et al, 1996; Takahashi et al, 1996）．すなわち，小脳の顆粒細胞には胎生期から ε2 サブユニットが発現しているが，ε2 サブユニットは生後減少し，約 3 週間後にはほとんど検出されなくなる．一方，ε1 サブユニットは生後ただちに発現を始め，これより遅れて ε3 サブユニットの発現が始まる（Watanabe et al, 1993）．彼らのデータは，この ε サブユニットの経時的発現パターンとよく一致しており，このシナプスで機能している NMDA 受容体は，ここで次々に発現される 3 種類の ε サブユニットのうちの 1 種類と ζ1 サブユニットとから構成されていると考えてよいであろう．成熟マウスの顆粒細胞には，ε1 および ε3 サブユニットがともに発現しているが，彼らのデータからは，これらのサブユニットはおのおの ζ1 サブユニットと複合体を形成し，独立に機能しているように思われる．

以上のように，いくつかのシナプスでは，そこで機能している NMDA 受容体のサブユニット構造がおおまかに推定されるようになってきた．しかし，シナプスによっては，実際に機能している NMDA 受容体のサブユニット構造を明らかにすることは，ノックアウトマウスを用いたとしても，当初考えられたほどに容易ではない．その理由は，分析対象となるシナプスを構成する入力系の複雑さや，通常のノックアウト法で作製されうるノックアウトマウスにも限界があること等が主な原因のように思われる．

NMDA 受容体の多様性の生理的意義は明らかになったか？

この問題は，NMDA 受容体の ε サブユニットには 4 種の異なるサブタイプが存在し，これらが時間的，空間的に異なる発現パターンを示すことの生理的意義は何か，と言い換えることができよう．上に述べたように，我々は，海馬 CA3 錐体細胞では，細胞の極性ないしは入力に依存して，ε1 および ε2 サブユニットが単一細胞内でソーティン

グされる可能性を示した（Ito et al, 1997）．海馬では，ε2 サブユニットは発生初期から成熟段階まで発現しており，一方，ε1 サブユニットは生後発現されてくることを考えると(Fig. 1)，主として ε2 型の NMDA 受容体が機能していると考えられる Fim-CA3 シナプスは，発生のごく初期から可塑的性質を維持していると考えられ，一方，主として ε1 型 NMDA 受容体が機能していると考えられる C/A-CA3 シナプスは，可塑的性質が生後獲得されると予想される．しかし，このように可塑性発現の時期が単一細胞内においても，シナプスによって異なることの意義，またサブユニットソーティングのメカニズム等については現在明らかでない．

ζ1 および ε2 サブユニットのノックアウトマウスにおいて，脳幹三叉神経核バレルの形成不全が報告された(Kutsuwada et al, 1996 ; Li et al, 1994)．しかし，同様に脳幹に発現される ε4 サブユニットのノックアウトマウスでは，このような異常が観察されないことから（Ikeda et al, 1995)，バレル形成に直接関連するのは ε2 型の NMDA 受容体ではないかと予想される．

小脳の顆粒細胞は生後約 2 週間の間に外顆粒層（external granular layer)から内顆粒層(internal granular layer)へ移行することが知られている．ε1 ノックアウトマウス(Sakimura et al, 1995)，ε3 ノックアウトマウス(Ebralidze et al, 1996）および ε1 サブユニットと ε3 サブユニットのダブルノックアウトマウス（Kadotani et al, 1996）において，この移行が正常であることから，顆粒細胞の移行に必要なのは発生初期に一過性に発現される ε2 型の NMDA 受容体ではないかと考えられる．

このほか，ε3 ノックアウトマウスで観察された，mossy fiber-顆粒細胞シナプスの non-NMDA 受容体応答の減少(Ebralidze et al, 1996）や，NMDA 受容体応答が観察されず，ε サブユニットの発現がみられない小脳プルキニエ細胞に発現されている ζ1 サブユニットの意味等（Mori and Mishina, 1995)，NMDA 受容体の多様性およびサブユニット固有の生理機能に関しては，明らかにされるべき多くの点が残されているように思われる．この状況を克服するには，部位特異的かつ時間的制御が可能な方法で，特定のサブユニットをノックアウトすることが必要であるように思われる．その意味で，Cre/LoxP 法により海馬 CA1 野特異的に ζ1 サブユニットがノックアウトされたマウスが作製されたことは，今後の研究の方向を示しているようにに思われる（McHugh et al, 1996 ; Tsien et al, 1996a, 1996b)．

Cre/LoxP 法とは，LoxP と呼ばれる特異的な塩基配列を認識して作用するファージ由来の recombinase の遺伝子である Cre を，部位特異的な発現を示す適当な蛋白質をコードする遺伝子のプロモーターによって発現されるようにしたトランスジェニックマウスと，標的遺伝子の両端に LoxP 配列が挿入された標的遺伝子組み換え体マウスを掛け合わせることにより，部位特異的に標的遺伝子がノックアウトされた動物を得る方法である（Tsien et al, 1996a)．この方法により，CA1 特異的に ζ1 サブユニットがノックアウトされたマウス（CA1-KO マウス）は，成熟個体まで正常に発育し，CA1 シナプス特異的に NMDA 受容体応答ならびに LTP が抑制され，また空間学習能が低下していたことが報告された（Tsien et al, 1996b)．また，CA1 野には迷路上の特定の場所に対応して発火頻度が上昇する，place-related activity を示す錐体細胞が存在する．この種の細胞は CA1-KO マウスにもみられたが，その場所特異性と協調的発火特性が有意に減少していることも報告されている（McHugh et al, 1996)．

おわりに

ここ数年，次々に NMDA 受容体サブユニットのノックアウトマウスが作製され様々な分析が試みられた結果，通常のノックアウト法の問題点が理解され，ノックアウト法自体が改良され，時間的，空間的にコントロールされたノックアウト法へと進化しつつある．この方向は今後さらに進歩する可能性があり，たとえば ε3 サブユニットの遺伝子プロモーターの制御下で Cre を発現させるようにこの遺伝子を組み込むことができれば，出生後の小脳顆粒細胞において特定の遺伝子をノックアウトすることが可能であるかもしれない．

このような利用しやすいノックアウトマウスが開発されることは重要であるが，一方ではその利用法を工夫する努力も重要であろう．またそこにこそ，生理学者，薬理学者そして解剖学者の経験と知恵が生かされるのではなかろうか？　ノックアウトマウスを用いる場合，プロジェクトの続く限り，たくさんのマウスを飼育管理しなければならず，このことは研究室のおかれた状況によっては，かなりの負担となろう．また，ノックアウトマウスは確かに魅力的な多くの可能性をもってはいるが，従来の薬理学的アプローチ等も重要な手法であることに変わりはなく，各サブユニットに特異的な作用を有する化合物の開発等も軽視されるべきではない．最近，イフェンプロディルやハロペリドール等が ε2 型の NMDA 受容体にアンタゴニスト作用を有することが報告されている（Williams, 1993 ; Kirson and Yaari, 1996 ; Ilyin et al, 1996)．また，動物の脳内にアンチセンス DNA を注入して，特定のサブユニットの発現を抑制する方法などは，通常，抑制の程度が低いとはいっても，特別な動物を飼育管理する必要がなく，生理学者や薬理学者には比較的馴染みやすい方法であるかもしれないし，また今後様々なアンチセンス核酸がデザインされる可能性もある（Yamada, 1996)．ノックアウトマウス，アンチセンス法そして薬理学的アプローチ等，おのおのの特長

を生かし，有効に利用していく工夫こそ，分析に携わるものに課せられた使命であると考える．

文 献

Ascher, P. and Nowak, L. (1987) Electrophysiological studies of NMDA receptors. Trends Neurosci, 10 : 284-288.

Bliss, T. V. P. and Collingridge, G. L. (1993) A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. Nature, 361 : 31-39.

Ebralidze, A. K., Rossi, D. J., Tonegawa, S. and Slater, N. T. (1996) Modification of NMDA receptor channels and synaptic transmission by targeted disruption of the NR2C gene. J Neurosci, 16 : 5014-5025.

Forrest, D., Yuzaki, M., Soares, H. D., Ng, L., Luk, D. C., Sheng, M., Stewart, C. L., Morgan, J. I., Connor, J. A. and Curran, T. (1994) Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in Neonatal Death. Neuron, 13 : 325-338.

Ikeda, K., Araki, K., Takayama, C., Inoue, Y., Yagi, T., Aizawa, S. and Mishina, M. (1995) Reduced spontaneous activity of mice defective in the ε4 subunit of the NMDA receptor channel. Mol Brain Res, 33 : 61-71.

Ilyin, V. I., Whittemore, E. R., Guastella, J., Weber, E. and Woodward, R. M. (1996) Subtype-selective inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors by Haloperidol. Mol Pharmacol, 50 : 1541-1550.

Isaac, J. T. R., Nicoll, R. A. and Malenka, R. C. (1995) Evidence for silent synapses: Implications for the expression of LTP. Neuron, 15 : 427-434.

Ito, I., Sakimura, K., Mishina, M. and Sugiyama, H. (1996) Age-dependent reduction of hippocampal LTP in mice lacking N-methyl-D-aspaltate receptor ε1 subunit. Neurosci Lett, 203 : 69-71.

Ito, I., Futai, K., Katagiri, H., Watanabe, M., Sakimura, K., Mishina, M. and Sugiyama, H. (1997) Synapse-selective impairment of NMDA receptor functions in mice lacking NMDA receptor ε1 or ε2 subunit. J Physiol (London), 500 : 401-408.

Kadotani, H., Hirano, T., Masugi, M., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M. and Nakanishi, S. (1996) Motor discoordination results from combined gene disruption of the NMDA receptor NR2A and NR2C subunits, but not from single disruption of the NR2A or NR2C subunit. J Neurosci, 16 : 7859-7867.

Kirson, E. D. and Yaari, Y. (1996) Synaptic NMDA receptors in developing mouse hippocampal neurones: Functional properties and sensitivity to ifenprodil. J Physiol (London), 497 : 437-455.

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. (1996) Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation and hippocampal LTD in NMDA receptor ε2 subunit mutant mice. Neuron, 16 : 333-344.

Li, Y., Erzurumlu, R. S., Chen, C., Jhaveri, S. and Tonegawa, S. (1994) Whisker-related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice. Cell, 76 : 427-437.

Liao, D., Hessler, N. A. and Malinow, R. (1995) Activation of postsynaptic silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. Nature, 375 : 400-404.

McHugh, T. J., Blum, K. I., Tsien, J. Z., Tonegawa, S. and Wilson, M. A. (1996) Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. Cell, 87 : 1339-1349.

三品昌美(1993) グルタミン酸受容体チャネル，シナプス可塑性，記憶．蛋白質 核酸 酵素，12：2177-2200.

Mori, H. and Mishina, M. (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel. Neuropharmacology, 34 : 1219-1237.

Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., Yagi, T., Aizawa, S., Inoue, Y., Sugiyama, H. and Mishina, M. (1995) Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor ε1 subunit. Nature, 373 : 151-155.

Seeburg, P. H. (1993) The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. Trends Neurosci, 16 : 359-365.

Takahashi, T., Feldmeyer, D., Suzuki, N., Onodera, K., Cull-Candy, S. G., Sakimura, K. and Mishina, M. (1996) Functional correlation of NMDA receptor ε subunits expression with the properties of single-channel and synaptic currents in the developing cerebellum. J Neurosci, 16 : 4376-4382.

Tsien, J. Z., Chen, D. F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E. H., Anderson, D. J., Mayford, M., Kandel, E. R. and Tonegawa, S. (1996a) Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. Cell, 87 : 1317-1326.

Tsien, J. Z., Huerta, P. T. and Tonegawa, S. (1996b) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. Cell, 87 : 1327-1338.

Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K. and Mishina, M. (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. NeuroReport, 3 : 1138-1140.

Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K. and Mishina, M. (1993) Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. J Comp Neurol, 338 : 377-390.

Williams, K. (1993) Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor : Selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. Mol Pharmacol, 44 : 851-859.

Yamada, M. (1996) Use of the antisense oligonucleotide technique in neuropsychopharmacology research. Jpn J Psychopharmacol, 16 : 129-138.

Abstract: Isao ITO (Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, 812-81 Japan) *Knockout mouse—Its characteristics and application (1): NMDA receptor subunit knockout mouse.* Jpn. J. Psychopharmacol., 17 : 185-192 (1997).

The N-methyl-D-aspartate (NMDA) type of glutamate receptors is thought to be essential in many central actions of neurotransmitter glutamate, including learning, memory, neurodevelopment and neurodegenerative disorders. Recent molecular cloning has revealed that the NMDA receptor has multiple subunits with distinct distribution, properties and regulation. This implies that NMDA receptors are different in molecular architecture and functional properties, depending on the brain region and developmental stage. To clarify the significance of the molecular diversity of NMDA receptors *in vivo*, a gene-targeting technique was applied to NMDA receptor subunit genes and several strains of mutant mice lacking targeted NMDA receptor subunit molecules were created. Using these NMDA receptor subunit knockout mice, various physiological, histological and behavioral analyses were performed. In this article, after briefly reviewing recent findings, we discuss the advantages and disadvantages of the NMDA receptor subunit knockout mouse as a tool for the studies of NMDA receptors and synaptic plasticity.

Key words: NMDA receptor, Knockout mouse, Synapse, Plasticity

(Reprint requests should be sent to I. Ito)