2. ジーンターゲティングによる行動異常の解析

八 木 健

岡崎国立共同研究機構生理学研究所 高次神経機構部門

Behavioral Abnormalities of Gene Targeted Mice

Takeshi YAGI

*Laboratory of Neurobiology and Behavioral Genetics,
National Institute for Physiological Sciences*

Summary

Part of the behavior in mammalian species is genetically programmed, and gene targeting technology using embryonic stem cells provides a powerful tool for the molecular analysis of genes involved in such behavior. Here we present how behavioral alterations were produced by disruption of an endogenous Fyn tyrosine kinase. These results may indicate that mutant mice produced by the gene targeting are useful for molecular analyses in mammalian behaviors and supply of animal models for human diseases.

緒 言

動物の行動が種物異性を持ち、子孫に遺伝することは、何らかの遺伝情報としてゲノム中に保存されていることを意味する。ヒトを含む哺乳動物においてもその例外ではない。近年、マウス胚性幹細胞を用いた遺伝子ターゲティング法が確立され、今まで困難であった哺乳動物における遺伝子と行動との関連性の解析が可能となってきた。我々はチロシンリン酸化酵素の Fyn が、哺乳動物の行動制御に重要な役割を果たしていることを遺伝子欠損マウスの作製とその解析により明らかにしてきた。

実験材料

我々は、徳永智之が C57BL/6 と CBA の F₁ 胚より樹立した TT-2 細胞を用いて遺伝子ターゲティング法を行った¹⁾。また、生まれたキメラマウスは C57BL/6 マウスとの掛け合わせによりヘテロ Fyn 欠損マウスを得、その掛け合わせによりホモ Fyn 欠損マウスを得た。行動実験にはホモ欠損マウスとヘテロ欠損マウスとの掛け合わせにより同腹で得られたマウスを遺伝子鑑定をせずにブラインドテストを行い、行動実験後に遺伝子鑑定をして統計処理を行った。

方 法

マウスゲノミックライブラリーより Fyn ゲノミック DNA を得て、ターゲティングベクターを作製した。ターゲティングベクター作製には Fyn の代わり

に β -ガラクトシダーゼが発現するように遺伝子構築を行い、ポジティブ選別として *neo* 遺伝子、ネガティブ選別として DT-A 遺伝子を用いた^{2,3)}。TT-2 細胞中にエレクトロポレーション法により制限酵素で線状化したターゲティングベクター DNA を導入し、G418 による薬剤選別を行った。相同組み換え体はサザンブロット法と PCR 法により判定した。得られた相同組み換え体はマイクロインジェクション法により 8 細胞胚に注入して、キメラマウスを作製した。キメラ率の高い雄マウスを野生型マウスと交配することによりヘテロ Fyn 欠損マウスを得た。マウスの飼育条件は始め 14 時間・10 時間（明・暗）、北米産のモミ材を 120°C、30 分オートクレーブしたものを床じきとして用いた。

実験成績

Fyn 欠損マウスを交配により得ることができた。ヘテロ遺伝子欠損マウスの β -ガラクトシダーゼ活性による発現様式の解析の結果、Fyn は神経管形成、神経細胞分化、神経突起伸長、ミエリン形成で特異的な発現をしていることが明らかとなり、成体中枢神経系では嗅球、海馬、小脳で特に高い発現が、また感覚神経経路での特徴的な発現が認められた⁴⁻⁶⁾。

Fyn 欠損マウスは殆んど大きな異常が認められなかったが、Fyn 欠損マウス同士を掛け合わせると、その子孫マウスは殆ど母乳を飲めずに死亡した。この原因

を解析するため野性型の雄と Fyn 欠損雌マウスを交配させたところ、産まれてきたヘテロ欠損仔マウスは母乳を飲んで正常に生育した。また、生まれた Fyn 欠損仔マウスを野生型雌マウスに育てさせると、正常に発育した。これらのことより、仔マウスの死亡の原因は Fyn 欠損マウスの母親と仔両方の原因によりおこることが明らかとなった。仔側の異常を調べるために母親の乳首に対する行動を観察したところ、Fyn 欠損仔マウスは一度も吸われていない乳首を探す能力が、正常の仔マウスに比べ劣っていることが明らかとなった⁷⁾。生後仔マウスが乳首を探す際には哺乳フェロモンが重要であることが知られており、Fyn 欠損マウスではこのフェロモンに対する感受性が減少していることが考えられる。この可能性を探る目的で生後直後の嗅覚神経系での Fyn の発現を β -ガラクトシダーゼの活性により解析した結果、Fyn は嗅上皮、鋤鼻器の感覚神経で高発現していることが明らかとなった。また、嗅覚の情報処理に重要に関わる嗅球においても高発現をしていることが明らかとなった。

また、Fyn 欠損マウス母親側の異常については出産時の連続観察により、産んだ仔マウスが引き離されて行く哺育行動の異常、羊膜・胎盤を処理しない等が観察された。この異常は、飼育環境に依存していることが最近明らかとなりつつある。

Fyn 欠損マウスは Grant 等により、海馬 CA1 領域での高頻度刺激による長期増強の減少が認められ、モリス水迷路学習における空間学習の異常が報告されている⁸⁾。我々の作製した Fyn 欠損マウスにおいてもマウス系統、欠損方法の違いがあるにも関わらず同様の空間学習の異常が認められた。しかし、モリス水迷路学習と同様に海馬依存的学習課題である八本迷路学習を行ったところ Fyn 欠損マウスにおいても学習の障害は認められなかった。また、受動的回避行動実験による学習効果を観察した結果、Fyn 欠損マウスは野生型マウスに比べてより学習が向上していることが明らかとなった¹⁰⁾。以上の結果より、Fyn 欠損マウスでは学習課題の違い、即ち学習課題で用いられる動機付けの違いにより学習行動障害に差があることが明らかとなった。モリス水迷路学習課題の際に認められる学習障害が Fyn 欠損マウスの学習過程での障害なのかについては今後慎重に検討する必要がある。

我々は Fyn 欠損マウスにおける哺育行動、モリス水迷路での学習障害より Fyn 欠損マウスでの情動行動異常の可能性を考え、情動行動に関する行動実験を

行った。その結果、Fyn 欠損マウスでは明るい場所を嫌う、新奇環境を嫌う等の情動行動での異常が明らかとなった⁹⁾。環境のストレスに対する感受性の亢進が認められており、この結果は上記した Fyn 欠損マウスでの哺育行動、モリス水迷路での学習障害を考える際、情動行動の異常を考慮する必要があることを示唆する結果として注目される。また、情動行動と相関関係が指摘されている聴覚性痙攣発作について、最近我々は Fyn 欠損マウスで痙攣が起りやすいことを明らかにしており、Fyn の情動行動制御における分子機構を考える際の興味深い結果として注目している¹⁰⁾。

総 括

マウス胚幹細胞を用いた遺伝子ターゲティング法の確立により、特定遺伝子欠損マウスの作製が可能となった。この技術により我々の作製した Fyn 欠損マウスでは、哺乳、学習、情動行動に異常が明らかとなった。この結果は Fyn が哺乳動物の行動を制御する分子の一つであることを示唆する。遺伝子ターゲティング法による行動制御の解析はまだ始まったばかりであるが、今後分子メカニズム解明だけでなく、ヒト疾患に関連する疾患モデル動物を産出して行く上でも重要な方向性であると確信している。

文 献

- 1) Yagi, T., Tokunaga, T., Furuta, Y., Nada, S., Yoshida, M., Tsukada, T., Saga, Y., Takeda, N., Ikawa, Y. and Aizawa, S.: *Anal. Biochem.*, **214**, 70 (1993)
- 2) Yagi, T., Ikawa, Y., Yoshida, K., Shigetani, Y., Takeda, N., Mabuchi, I., Yamamoto, T. and Aizawa, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9918 (1990)
- 3) Yagi, T., Nada, S., Watanabe, N., Tame-moto, H., Kohmura, N., Ikawa, Y. and Aizawa, S.: *Anal. Biochem.*, **214**, 77 (1993)
- 4) Yagi, T., Shigetani, Y., Okado, N., Tokunaga, T., Ikawa, Y. and Aizawa, S.: *Oncogene*, **8**, 3343 (1993)
- 5) Yagi, T., Shigetani, Y., Furuta, Y., Nada, S., Okado, N., Ikawa, Y. and Aizawa, S.: *Oncogene*, **9**, 2433 (1994)
- 6) Yagi, T., Aizawa, S., Tokunaga, T., Shigetani, Y., Takeda, N. and Ikawa, Y.: *Nature*, **366**, 742 (1993)
- 7) Yagi, T.: *Dev. Growth & Differ.*, **36**, 543 (1994)
- 8) Grant, S.G.N., O'Dell, T.J., Karl, K.A.,

- Stein, P.L., Soriano, P. and Kandel, E.R. :
Science, **258**, 1903 (1992)
- 9) Miyakawa, T., Yagi, T., Watanabe, S. and
Niki, H. : *Mol. Brain Res.*, **27**, 179 (1994)
- 10) Miyakawa, T., Yagi, T., Taniguchi, M. and
Niki, H. : *Mol. Brain Res.*, **28**, 349 (1995)