

# 博士論文

小脳プルキンエ細胞における mTOR シグナルの機能解析

坂井 祐介

# 小脳プルキンエ細胞における mTOR シグナルの機能解析

東京大学大学院 医学系研究科

病因・病理学専攻 動物資源学部門

指導教員：饗場篤 教授

申請者名：坂井祐介

# 目次

第1章 要旨	4
第2章 序文	5
第3章 材料と方法	20
第4章 結果	36
第5章 考察	55
第6章 謝辞	70
第7章 参考文献	72
第8章 図表	95

## 第 1 章 要旨

mTOR シグナルの亢進が、様々な神経疾患に寄与していることが報告されている。しかしながら、小脳において、mTOR 自身を直接活性化することで mTOR シグナルの亢進を行った例は報告されていない。本研究では、小脳プルキンエ細胞特異的に活性型 mTOR を発現させたトランスジェニックマウスを用いて、mTOR シグナルの機能解析を試みた。活性型 mTOR の発現により、小脳プルキンエ細胞の肥大化、脱落が見られ、運動機能にも異常が見られた。また、幼少期のプルキンエ細胞に投射する登上線維の刈り込みにも異常があった。本研究は、小脳プルキンエ細胞における mTORC1 シグナルの亢進がプルキンエ細胞の発生及び発達に異常をきたすことを示すものである。

## 第2章 序文

### 2.1 はじめに

mammalian (or mechanistic) target of rapamycin (mTOR) シグナル経路において、mTOR 自身を小脳において直接、活性化したトランスジェニック (Tg) マウスはこれまでに作製されていない。小脳における mTOR シグナルの亢進は、様々な神経変性疾患などの神経疾患において見られていることから、その働きが重要であることは十分に考えられる。そこで、本研究では小脳における mTOR シグナルの機能解析を目的として、研究を遂行した。本章では、mTOR および mTORC シグナルに関連する疾患等について記述する。

### 2.2 mTOR

mTOR は、免疫抑制剤として知られているラパマイシンの標的分子として特定されてきた。ラパマイシンは、1965 年にイースター島の土壌に生息する放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* から産生されることが発見され、1970 年代に当初

は広く抗増殖作用を持つ物質として単離された (Benjamin *et al.*, 2011)。mTOR は分子量 289kDa のセリン・スレオニンキナーゼで、PIKK (phosphoinositide kinase-related kinase) ファミリーに属するタンパク質であり、栄養状態や増殖因子などのシグナルを統合し、細胞の成長や代謝を担っている。すべての真核生物において、高度に進化的に保存されており、広範かつ恒常的に発現している。そのドメイン構造は、N 末端側から HEAT repeats ドメイン (Huntingtin, Elongation factor 3, Protein phosphatase 2A subunit, TOR1 に由来)、FAT (FRAP, ATM, TTRAP または focal adhesion targeting) ドメインが存在する (図 1 A)。さらに、C 末端側にキナーゼ触媒ドメインと FKBP12-ラパマイシン複合体が結合する FKBP-rapamycin-binding (FRB) ドメインが存在する。そして、C 末端には上流の FAT ドメインと対になる FATC (FAT C-terminal) ドメインが存在し、すべての PIKKs においてキナーゼ活性を制御すると考えられている (Laplanche and Sabatini, 2012)。

### 2.3 mTORC1 と mTORC2 シグナル経路

mTOR は、2 つのタンパク質複合体として存在し、それぞれ mTOR complex 1 (mTORC1) および complex 2 (mTORC2) と呼ばれる。mTORC1 は 6 つのタンパ

ク質の複合体から成り、mTORC2 は 7 つのタンパク質の複合体から成る (図 1 B)。mTORC1 は非常に高いラパマイシン感受性であるのに対して、mTORC2 はラパマイシンの急性投与には非感受性であることが知られている。

mTORC1 は、アミノ酸刺激や細胞内エネルギー状態などに応答し、その基質である S6 kinase 1 (S6K1) および eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) - binding protein 1 (4E-BP1) を直接リン酸化することで、タンパク質合成の亢進や脂肪合成、エネルギー代謝の促進を行う (図 1 C)。S6K1 は、Thr229 および Thr389 をリン酸化されることで活性化される (Fenton and Gout, 2011)。活性化 S6K1 は、その下流標的分子である ribosomal protein S6 (rpS6) や eukaryotic initiation factor 4B (eIF4B)、programmed cell death 4 protein (PDCD4) をリン酸化する (Banerjee *et al.*, 1990; Dorrello *et al.*, 2006; Kozma *et al.*, 1990; Raught *et al.*, 2004; Shahbazian *et al.*, 2006)。rpS6 はタンパク質合成に関与し (Pende *et al.*, 2004; Ruvinsky *et al.*, 2005)、eIF4B は細胞増殖やその生存に関連 (Shahbazian *et al.*, 2010)、PDCD4 は mRNA の翻訳制御に関連している (Yang *et al.*, 2003)。一方、4E-BP1 は、リン酸化されていないと eIF4E と結合することで翻訳開始を阻害している (Pause *et al.*, 1994)。4E-BP1 は、mTORC1 により Thr37, Thr46, Ser65, Thr70 の 4 箇所をリン酸化を受けられることで、eIF4E から解離する (Gingras *et al.*, 1999)。その結果、eIF4E の制御

状態に感受性の高い細胞増殖や生存に関連する遺伝子の翻訳が亢進される (Graff and Zimmer, 2003; Sonenberg and Hinnebusch, 2009)。また、興味深いことに、*Drosophila melanogaster* における dS6K 及び d4E-BP は細胞サイズおよび細胞増殖に関連することが報告されている (Montagne *et al.*, 1999; Miron *et al.*, 2001) が、哺乳類における 4E-BP は細胞のサイズには影響を与えず、S6K のみが細胞のサイズに影響することが知られている (Pende *et al.*, 2004; Ohanna *et al.*, 2005)。このように、mTORC1 は、S6K1 や 4E-BP1 を直接リン酸化することで、タンパク質合成や細胞増殖や生存、サイズを制御している。

mTORC1 シグナルには **negative feed back** 機構が存在しており、通常の細胞では mTORC1 の活性が亢進することにより mTORC1 シグナル全体の活性が負に制御されるようになる。具体的には、mTORC1 の下流分子である S6K1 が直接リン酸化を受け、リン酸化された S6K1 が上流の insulin receptor substrate-1 (IRS1) をリン酸化する。これにより、IRS1 は自身の分解を亢進するとともに、**growth factor** から mTORC1 へと伝わるシグナルを低下させる (Harrington *et al.*, 2004)。

また、mTORC1 が直接 IRS1 を負に制御することで、**growth factor** 由来のシグナルを制御している (Tzatsos and Kandror, 2006)。その結果として、IRS1 の下流に位置する PI3K シグナルが低下することになる。実際、結節性硬化症の原因遺伝

子である *Tsc1* を欠損させた細胞において、mTORC1 シグナルを恒常的に亢進させると PI3K シグナルの低下が見られている (Harrington *et al.*, 2005)。加えて、S6K1 は、mTORC2 の構成タンパク質である Rictor の Thr1135 をリン酸化することが知られており、これにより mTORC2 のシグナルが低下する (Dibble *et al.*, 2009; Julien *et al.*, 2010)。また、リン酸化された S6K は、mTORC2 シグナルの上流にある IRS1 および mTORC2 構成タンパク質の 1 つである SIN1 を負に制御することも報告されている (Liu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2008)。このように、mTORC1 シグナル亢進は、自身の mTORC1 シグナルを負に制御するだけでなく、mTORC2 のシグナルも負に制御する negative feed back 機構を持つ。

mTORC1 シグナルは、タンパク質合成や細胞増殖の亢進だけでなく、オートファジーの抑制にも関与している。富栄養条件下では、亢進された mTORC1 が unc-51-like kinase 1 (ULK1) 複合体をリン酸化することでオートファジーを抑制している。脳におけるオートファジーの生理機能については、未知な部分が多いが、遺伝的にオートファジー機能の異常は、振戦や痙攣、軸索変性などを引き起こしている (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006, 2007)。注目すべきは、これらの症状は、神経変性疾患に見られる症状と類似していることである。また、近年、オートファジーにより樹状突起スパインの刈り込みが行われていることがわか

り、その機構に mTORC1 シグナルが関連していることが報告されている (Tang *et al.*, 2014)。このマウスでは、*Tsc2* をノックアウトすることにより mTORC1 シグナルを恒常的に亢進すると、自閉症様の行動や前述したオートファジー機序の異常により発生期のスパイン刈り込みが正常に起こらなかった。オートファジーは、成熟した神経細胞と分裂している細胞において役割が異なることも知られている。例えば、*Tsc2* を欠損させた神経細胞においては、mTORC1 を恒常的に活性化するとオートリソソームの蓄積およびオートファジーが見られた (Di Nardo *et al.*, 2014)。このように、mTORC1 シグナルとオートファジーの関連は明らかであるが、そのメカニズムには未知な部分が多い。

mTORC2 はアクチン骨格系を制御しており、この機構はがん細胞において、腫瘍における細胞運動性や浸潤、転移に関係している (Zhou *et al.*, 2011)。また Akt (Sarbasov *et al.*, 2005) や serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) (García-Martínez *et al.*, 2008)、protein kinase C (PKC) ファミリー (Ikenoue *et al.*, 2008) を下流の標的因子として持つ。特に Akt は抗アポトーシス機構として多くの細胞生存に寄与していることが知られているが、詳細な機構については未知な部分が多く残されている (Benjamin *et al.*, 2011)。

## 2.4 mTORC1 シグナルと神経疾患

mTOR シグナルは細胞内シグナルの中枢を担っており、その異常はがんや糖尿病、肥満へと繋がる (Yang *et al.*, 2012)。また真核生物において、mTOR は必須遺伝子であり、マウスにおいて全身ノックアウトを行うと致死となる (Gangloff *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2004)。そして脳の神経細胞においても、mTOR シグナルが重要な役割を担っていることも報告されている。mTOR は、早期の終脳発達に必須であること (Hentges *et al.*, 2001) や神経回路の構築や維持 (Raab-Graham *et al.*, 2006)、経験依存的なシナプス可塑性 (Auerbach *et al.*, 2011; Ehninger *et al.*, 2008) や睡眠時のタンパク質合成 (Seibt *et al.*, 2012) といった様々な制御に関与している。また mTOR シグナルの亢進は、軸索誘導の異常 (Nie *et al.*, 2010) や樹状突起形成やシナプス可塑性に異常を来すこと (Swiech *et al.*, 2008) が報告されている。

mTOR シグナル中に存在する遺伝子の中で、神経発生異常に関与することが知られているのは、mTORC1 を抑制的に制御する結節性硬化症の原因遺伝子である TSC1 および 2 や phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) などである。TSC1 および 2 の異常により mTOR シグナルの亢進が起こ

ると、全身に過誤腫を生じるだけでなく、てんかんや Autism spectrum disorders (ASDs)、知的障害といった症状が見られる (Crino *et al.*, 2006)。また PTEN の異常は ASDs や巨頭症やそれに似た症状に繋がる (Pilarski *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2012)。そして、mTORC1 シグナルの亢進は、てんかん性の脳障害の原因遺伝子として同定されている (Allen *et al.*, 2013; Kassai *et al.*, 2014)。また Alzheimer disease や Huntington disease といった神経変性疾患においても mTOR シグナルの異常により、神経変性や神経細胞死が引き起こされている (Caccamo *et al.*, 2011; Spilman *et al.*, 2010; Bové *et al.*, 2011; Ravikumar *et al.*, 2004)。興味深いことに、これらの神経疾患における mTOR シグナルはいずれの疾患においても亢進していることが報告されている。

## 2.5 mTOR シグナルとトランスジェニックマウス

さて、小脳は運動協調や運動学習を司る領域であるが、小脳においても mTOR シグナルの異常と神経変性疾患との関連が報告されている。特に、ASDs や angelman syndrome (AS) において mTOR シグナルの亢進が見られている (Sun *et al.*, 2015)。自閉症患者の脳における所見として、大脳皮質のサイズが大きくなっ

ていること (Herbert *et al.*, 2004) や前頭葉において神経細胞の樹状突起密度の減少 (Williams *et al.*, 1980) 、樹状突起の分枝の減少 (Kemper and Bauman, 1993) などが報告されている。また、一部の自閉症患者では、小脳においてプルキンエ細胞の脱落が起こっている (Amaral *et al.*, 2008)。このようなプルキンエ細胞の脱落は、小脳プルキンエ細胞特異的に *Tsc1* 遺伝子を欠損することで mTOR シグナルを亢進した Tg マウス (Tsai *et al.*, 2012) や mTORC1 の構成タンパク質である *Raptor* を欠損させることで mTORC1 シグナルを欠損させた Tg マウス (Angliker *et al.*, 2015) の両方において見られている。これらの Tg マウスにおけるプルキンエ細胞の脱落は、アポトーシスにより引き起こされていた。また、これらの Tg マウスのプルキンエ細胞において、mTORC1 シグナルが亢進していると、プルキンエ細胞の脱落と同時にプルキンエ細胞の肥大化が見られた。さらに、行動解析を行ったところ、いずれの Tg マウスにも運動協調に障害があり、社会行動の異常といった ASDs の特徴となるような表現型も観察された。

近年、本研究室において、mTOR 自身を時空間特異的に活性化することが可能な Tg マウスを作製した。この Tg マウスは、胎生期の前脳において mTOR を活性化させると大脳皮質の萎縮が見られたのに対し、成体の大脳皮質において活性化させると皮質の肥大化が確認された。さらに成体の Tg マウスでは、mTORC1

シグナルの亢進により致死的なてんかん発作を伴うことが確認された (Kassai *et al.*, 2014)。

## 2.6 小脳プルキンエ細胞の神経支配

小脳皮質のニューロンは 3 層構造からなっており、最深部の顆粒層、中間部のプルキンエ細胞層、最も外側にある分子層がある (図 2)。プルキンエ細胞は、プルキンエ細胞層に存在し、上方に向かって扇状の樹状突起を分子層に伸ばしている。また、プルキンエ細胞は、小脳皮質における唯一の出力神経細胞であり、登上線維及び平行線維からの興奮性の入力を受けるとともに、介在ニューロンから抑制性の入力を受けている。プルキンエ細胞の軸索は、小脳皮質のすべての出力を担っており、深部小脳核や脳幹の前庭神経核に投射している。1つのプルキンエ細胞に対してシナプスを形成する平行線維は約 200,000 本あるのに対して、ほとんどの登上線維は 1 本である。登上線維の 1 本のみの神経支配については後述するが、1本の登上線維がプルキンエ細胞の樹状突起上に多くのシナプスを形成し、そのシナプス伝達効率は平行線維に比べて高い。また、プルキンエ細胞は、自発的に活動電位を発火している。これは平行線維由来の入力であり、

平行線維に投射している複数の苔状線維からの入力により引き起こされている。一方、登上線維由来の入力では、複雑スパイクと呼ばれる 1 本の大きな活動電位を生じたのち複数の小さな発火 (spikelet) が続く (Apps and Hawkes, 2009; Gao *et al.*, 2012)。登上線維由来の入力と平行線維由来の入力が同時に行われることで、平行線維によるシナプス応答が持続して低下する長期抑圧が引き起こされる。間違った行動に対して応答した登上線維と同時に平行線維からの入力が起こることで、抑圧される。これを繰り返すことで、長期抑圧により小脳における運動学習がなされていると考えられている (Ito, 2001)。

生後初期のプルキンエ細胞は下オリーブ核から伸びる複数の登上線維により神経支配を受けている。発生過程が進むに連れて、このプルキンエ細胞に投射する複数の登上線維は、徐々に刈り取られ、離乳期 [postnatal 21 day (P21)] 頃には、1 本の登上線維のみによる神経支配を受けるようになることが知られている (Kano *et al.*, 1995, 1997, 1998)。これらの報告では、プルキンエ細胞において高発現している PKC $\gamma$  や type 1 metabotropic glutamate receptor (mGluR1)、phospholipase C (PLC)  $\beta$ 4 といったタンパク質の変異マウスを作製し、プルキンエ細胞を支配する登上線維の数を調べたところ、いずれの変異を導入したマウスにおいてもプルキンエ細胞が複数の登上線維による神経支配を受けていた。プルキンエ細

胞は、生後初期に複数の登上線維により神経支配されている状態から、P7頃までに1本の登上線維が選択的に強化される (Hashimoto and Kano, 2003)。生後初期の登上線維は、プルキンエ細胞の細胞体に投射しているが、選択的に強化された勝ち残った登上線維のみが、P9にかけて、投射先を細胞体から樹状突起へとシフトしていく。そして、それ以外の登上線維は細胞体近傍に取り残され、P15までに刈り取られることが報告されている (Hashimoto *et al.*, 2009)。

## 2.7 樹状突起の self avoidance と mTOR シグナル

神経細胞から伸びる樹状突起は、本来、各々が重なることを避けるように自己忌避機構 (self avoidance) が存在する。樹状突起の形成や維持の異常は、統合失調症やダウン症、脆弱 X 症候群、Angelman 症候群、そして自閉症に関与することが報告されている (Bagni and Greenough, 2005; Bourgeron, 2009; Dindot *et al.*, 2008; Garey *et al.*, 1998; Kaufmann and Moser, 2000; Walsh *et al.*, 2008)。樹状突起の形成や維持に関与する分子の同定は *D. melanogaster* で進んでおり、その中で mTOR シグナル関連の分子としては、Akt や TORC2 がある。Akt を含む Ras-PI3K-Akt-mTOR シグナル経路のみの亢進により、ニューロンの細胞体および樹

状突起のサイズが増大し、また、同時に Ras-MAPK (mitogen-activated protein kinase) シグナル経路を亢進させることで、樹状突起の分枝の増加が見られた。

これらのことから、Akt は樹状突起の成長促進および哺乳類の皮質ニューロンの分枝にも関与していることが明らかになっている (Kumar *et al.*, 2005)。TORC2 は、*D. melanogaster* のクラスIV樹状突起分枝において、樹状突起の成長制限やタイミングに必要と考えられている。TORC2 の構成タンパク質である sin1 や rictor に変異を導入した *D. melanogaster* では、不適切な樹状突起同士の重なりが見られた (Koike-Kumagai *et al.*, 2009)。また、マウスの海馬において、mTORC1 シグナルがニューロンの細胞体や樹状突起の成長、シナプス伝達に関与することが報告されている (Ding *et al.*, 2016; Weston *et al.*, 2014)。培養した海馬ニューロンにおいて、mTOR シグナルを抑制的に制御する PTEN および Tsc1 を欠損させると細胞体のサイズが増加し、樹状突起の伸長が亢進された。しかしながら、興味深いことに、シナプス伝達においてはそれぞれ別の表現型が見られた。PTEN を欠損させた海馬ニューロンでは、興奮性および抑制性の神経伝達が増大されたのに対し、Tsc1 を欠損させたニューロンでは、興奮性の神経伝達には影響がなく、抑制性の神経伝達のみが減少した。これら 2 つの遺伝子の欠損によりいずれも mTORC1 シグナルを亢進させるが、mTORC1 シグナルの negative feed back

機構による Akt のリン酸化が PTEN 欠損ニューロンでは増加し、Tsc1 欠損ニューロンでは減少していたために起こっていると考えられる。また、マウスの成熟した海馬ニューロンにおいて、Notch シグナルを低下させると mTORC1 シグナルも低下し、樹状突起の分枝数の減少や伸長に異常が見られた。一方で、Notch シグナルを過剰に増強すると、mTORC1 シグナルも増強され、樹状突起の分枝のみが著しく促進された。このことから、mTORC1 シグナルの増強は、樹状突起の分枝を促進することが考えられる。

## 2.8 mTORC1 シグナルの亢進

これまでに mTORC1 シグナルの亢進と様々な神経疾患との強い関連性があることが示唆されているが、なぜ mTORC1 シグナルの亢進がこのような疾患に繋がるか未だ不明な点が多い。また、先に述べた *Tsc1* をノックアウトした自閉症モデルマウスの報告により、小脳プルキンエ細胞における mTOR シグナル亢進と自閉症との関連が示唆されている。しかしながら、この自閉症モデルはプルキンエ細胞特異的に *Tsc1* をノックアウトすることで間接的に mTORC1 シグナルを亢進しており、実際に mTORC1 シグナルが自閉症に関与しているかは不明で

ある。また、mTORC1 シグナルの亢進の度合いにより、病態の重篤化等に変化があるのかといった点についても不明である。そこで、本研究では、活性型 mTOR を小脳プルキンエ細胞特異的に発現させ、小脳における mTORC1 シグナルの機能解明を行った。

## 第3章 材料と方法

### 3.1 マウス

すべての動物実験は東京大学および広島大学のガイドラインに従って行った。マウスは、明期および暗期がそれぞれ 12 時間の環境下(明: 8-20 時、暗: 20-8 時)で飼育した。飼料には、日本クレア株式会社の飼育繁殖用飼料 CE-2 を使用し、自由摂餌とした。ドキシサイクリン (Dox; Doxycycline hyclate, Sigma) は、200 mg/l になるように限外濾過水で希釈し、給水瓶を用いて投与した。本研究で用いた Control マウス (Dox+) への Dox の投与は、親世代の交配時より開始し、以後毎週 2 回 (火曜日および金曜日) に交換し、実験に用いるまで投与を継続した。一方、L7-mTOR Tg マウスには、自動給水によって限外濾過水を与えた。小脳ブルキンエ細胞特異的に活性型 mTOR を発現する L7-mTOR Tg マウスは、TRE-mTOR Tg マウスと L7-tTA マウスを交配することによって作製した。TRE-mTOR Tg マウスは、テトラサイクリン応答因子 (TRE) の下流に、ラット活性型 mTOR (Ohne *et al.*, 2008) の cDNA を連結したトランスジーンを持つマウスである (Kassai *et al.*, 2008)。活性型 mTOR の N 末端には FLAG タグが付加されるよう

にした。一方、L7-tTA マウスは小脳プルキンエ細胞特異的に遺伝子発現を誘導できる L7 プロモーターの下流にテトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (tTA) を配置したマウスである (Nakao *et al.*, 2007)。なお、本研究で用いたマウスの遺伝的背景は、C57BL/6 と ICR の雑種である。

### 3.2 薬物投与

Rapamycin (R-5000, LC Laboratories) は、99.5 % エタノール (14713-53, nacalaitesque) に溶かしたストック溶液 (25 mg/ml) を作製し、投与時に希釈液 (5% Tween-80, 5% polyethylene glycol 400) により、10 mg/kg になるように腹腔内に投与した。コントロールには、99.5 % エタノールを同希釈液により 25 倍希釈し、投与した。3-6 週齢のマウスに対して、週に 3 回 (月・水・金) の同じ時刻に投与を行った。HIF1 $\alpha$  阻害剤の PX-478 (PX-478 HCl, #202350, MedKoo Biosciences) は、DMSO (D2650, SIGMA) に溶かしたストック溶液 (40 mg/ml) を作製し、投与時に PBS で希釈し、40 mg/kg になるように腹腔内に投与した。コントロールには、DMSO を PBS により 8 倍希釈し、同量投与した。投与時間および時期は、rapamycin 投与と同じである。

### 3.3 タンパク質抽出およびウェスタンブロット

1-6 週齢の Control および L7-mTOR Tg マウスを頸椎脱臼によって安楽死を施し、小脳を摘出した。摘出した小脳は PBS で洗浄後、すみやかに液体窒素を用いて凍結した。次に、小脳の質量の 10 倍量の Lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail (Complete EDTA-free, Roche), phosphatase inhibitor cocktail (PhosStop, Roche) ] を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。得られた懸濁液は 4°C で 1 時間インキュベートした後に、20,000 × g、5 分間遠心し、上清をタンパク質抽出液として回収した。タンパク質抽出液は、Bradford 法 (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Thermo Scientific) によってタンパク質濃度を定量した。

SDS-PAGE は、8% ポリアクリルアミドゲルで 20 mA、約 80 分泳動を行った。泳動サンプルは、タンパク質濃度を一定に揃え、5× SDS サンプル処理液を加え、95 °C で 5 分間熱処理を行った小脳抽出液を用いた。SDS-PAGE により分離したタンパク質をウェット式の転写装置 (NA-1510, NIHON EIDO) を用い、polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P, Millipore) に転写した。この際、

転写バッファーには (100 mM Tris, 192 mM Glycine, 10 % メタノール) を用いて、50 V, 120 分間転写を行った。転写後のメンブレンを TBS (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, pH7.4) で 1 分間振盪後、ブロッキング液 [TBS + 0.05 % Tween 20 (TBST) + 5% スキムミルク] で 30 分間、室温でインキュベートした。その後、wash 液 (TBST + 1% スキムミルク) で抗 FLAG 抗体 (A8592, Sigma) を 1 µg/µl に希釈、抗 β-actin 抗体 (A2228, Sigma) を 2 µg/µl に希釈し、抗体反応を 4 °C で一晩行った。wash 液によりメンブレンの洗浄を 10 分間、3 回行った後、horse radish peroxidase が結合した 2 次抗体 (Jackson Immunoresearch) を用いて 90 分間、室温でインキュベートを行った。反応後、wash 液を用いてメンブレンの洗浄を 10 分間、3 回行い、最後にメンブレンを TBS で 1 回洗浄した。抗体検出には、化学発光試薬 (ECL prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare) を室温で 5 分間反応させ、X 線フィルム (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) でバンドを検出した。

### 3.4 組織染色

還流固定および切片の作製

ネンブタール (大日本住友製薬) の過剰投与によって麻酔をかけたマウスを開胸し、定量送液ポンプ (MP-2000, EYELA) を用いて、0.1 M PB (phosphate buffer, pH 7.4) を溶媒とした 4 % PFA (paraformaldehyde, ナカライテスク) 溶液を心臓より灌流した。摘出した脳を 4 % PFA 溶液により 4 °C で 3 時間後固定した後、0.1 M PB を溶媒とした 30 % スクロース溶液に浸漬した。脳が 30 % スクロース溶液に完全に沈んだ後、下記の通り切片作製を行った。

フリージングマイクロトームを用いた薄切によって、40  $\mu$ m 厚の切片を作製し、0.01 %  $\text{NaN}_3$  を含む PBS 中に保存した。また、クライオスタット (CM1850, Leica) による切片作製は、小脳を OCT compound (Sakura Finetek) により包埋し、20  $\mu$ m の厚さにカットした切片を、MAS コートスライドガラス (S9441, 松浪硝子) に貼り付けた。

## **Nissl 染色**

Nissl 染色に用いた切片は、フリージングマイクロトームを用いて作製し、ゼラチンコートしたスライドガラスに貼り付けた。十分に乾燥させた後、0.1 % クレシルバイオレット溶液を用いて 5 分間染色した。その後、50 % エタノールに 1 分間、70 % エタノールに 1 分間、95 % エタノールに 10 分間で順に浸けた。続

いて、脱水 (99.5% エタノールに 1 分、2 分、3 分、4 分ずつ計 4 回浸漬)、透徹 (キシレンに各 1 分、2 分、3 分、4 分ずつ計 4 回浸漬) を行い、封入剤 (Entellan new, Merck Millipore) を用いて封入した。

## 免疫組織染色

組織染色に用いた切片および蛍光免疫組織染色に用いた切片は、PBS で洗浄後、ブロッッキング液 (3% 正常ヤギ血清, 0.1% TritonX-100 in PBS) に 30 分間、室温で浸した。ブロッッキング後、1 次抗体反応を 4 °C で一晩抗体を行った。用いた一次抗体は次の通りである。抗 phospho-S6 抗体 (Ser235/236, #2211, Cell Signaling Technology、200 倍希釈)、抗 cleaved caspase-3 抗体 (#9661, Cell Signaling Technology、200 倍希釈)、抗 heme oxygenase-1 抗体 (ab13248, Abcam、3.33 µg/µl)、抗 HIF1 抗体 (ab1, Abcam、10 µg/µl)、抗 Calbindin 抗体 (AB1778, CHEMICON INTERNATIONAL、1000 倍希釈; #300, Swant、1000 倍希釈)、抗 vGluT2 抗体 (2 µg/ml, 北海道大学 渡辺雅彦教授より分与)。一次抗体反応を行った切片は、PBS で 10 分間、3 回洗浄を行った後に、2 次抗体反応を 2 時間、室温で行った。2 次抗体には、Alexa-488 または Alexa-546 が結合した抗マウス IgG 抗体あるいは抗ウサギ IgG 抗体 (4 µg/µl, Life Technologies) を用いた。核染色には TO-PRO-3

(Life Technologies) を用いた。二次抗体反応後、PBS で 10 分間 3 セットの洗浄を行い、封入剤 (VECTASHIED Mounting Medium, H-1000, VEC) を用いて封入した。フリージングミクロトームで作製した切片は、封入前に APS コートスライドガラス (スーパーフロストホワイト APS, S8441, 松波硝子) に貼り付け、VECTASHIED を用いて封入した。また、抗 phospho-S6 抗体染色は、DAB 発色によって結合した抗体を可視化した。組織染色は、Control と L7-mTOR Tg マウスを同時に行うことで、染色の公平性に配慮した。組織の観察には、蛍光顕微鏡 (BioZero, Keyence) および共焦点レーザー顕微鏡 (TSC-SP5II, Leica) を用いた。また、抗 phospho-S6 抗体によるプルキンエ細胞の細胞体の蛍光強度定量には、Image J (National Institutes of Health) を使用した。

### 3.5 行動解析

#### **habituation**

行動解析は、いずれの実験も開始時刻を正午とした。行動解析に先立って、マウスを片手に 1 匹ずつ 5 分間乗せることによって解析者や手袋などに馴化させた。この馴化を行動解析と同時刻に 1 週間毎日行った後に、行動解析を行った。

行動解析に用いた個体はいずれも 6-12 週齢の雄マウスを用いた。

### **ロータロッド解析**

ロータロッド (MK-660C, 室町機械) を用いて、ロータロッド試験を行った。ロータの直径は 30 mm (マウス用) を使用し、計測には MODE C (到達回転数 : 40 rpm、加速時間 : 300 秒) を用いた。MODE C は、開始時に到達回転数の 10 分の 1 の速度 (4 rpm) で回転しており、ロータにマウスを乗せてから計測開始ボタンを押すことで一定の加速度で回転数が上昇し、300 秒後に到達回転数 (40 rpm) に達する。マウスが測定開始後からロータより落下するまでの時間を計測した。300 秒以上マウスが落ちなかった場合は、記録値を 300 秒として記録した。ロータロッド終了後に、マウスの体重を測定し、記録した。ロータロッド試験および体重測定は 1 日 1 回ずつ行い、5 日間連続で行った。統計学的な評価は、GraphPad Prism 7 (MDF) を用いて行った。

### **foot print テスト**

ロータロッド試験後の 11-12 週齢のマウスを用いて、foot print テストを行った。マウスを保定した状態で、後肢の足裏に墨汁 (洗濯で落ちる墨汁, サクラク

レパス) をつけた。記録用の紙には、A3 コピー用紙 (KB 用紙, KB-38N, KOKUYO) を縦長になるように3等分し、約 10 cm (横)、42 cm (縦)の三角柱の状態で使用した。墨汁をつけたマウスを折ったコピー用紙の入り口に置き、反対側まで歩行させることで記録を行った。それぞれのマウスにつき、三角柱の3面分 (3回分ずつ) 記録を行い、同側の足の爪先を直線で結び、反対側の足の軌跡上に直行する長さを後肢の開き (幅) として測定した。

#### オープンフィールドテスト

塩化ビニル製の円形オープンフィールド (直径 500 mm、高さ 400 mm、室町機械) を用いて、オープンフィールドテストを行った (図 8 A, 左)。各マウスの行動解析前に、70%エタノールで床面および壁面の清掃・乾燥を行い、糞尿およびマウス等のおいを取り除いた状態にした。また、実験は蛍光灯照明下で行った。マウスの行動記録には CCD カメラ (XC-117, SONY) を使用し、CCD カメラより出力されたデジタルビデオ信号をパソコン上の実験動物トラッキングソフトウェア (DVTrack, 室町機械) によりマウスの行動を追跡し、円形 25 区画オープンフィールドソフトウェア (CompACT VAS, 室町機械) により解析を行った。

行動測定の手順は、トラッキングソフトウェアの記録開始合図に合わせて、マ

ウスをオープンフィールドの中央部にセットし、10 分間オープンフィールド内を自由行動させ行動軌跡を記録した。マウスの行動軌跡を円形 25 区画オープンフィールドソフトウェアにより、マウスの総行動時間、総行動距離、各区画 (中央：1-9 の区画、周辺部：10-25 の区画) の滞在時間を算出した (図 8 A, 右)。

### 社会行動解析 (3-chamber test)

実験には透明アクリル製の 3-CHAMBERED SOCIAL TEST CAGE (外寸：幅 620 mm、高さ 410 mm、奥行 225 mm, 一室内寸法：幅 200 mm、高さ 400 mm、奥行 220 mm, BS-402260, BrainScience・idea) を用いた。各室 (chamber) 間は、中央下部に幅 50 mm、高さ 80 mm の出入り口により行き来が可能になっており、出入り口に取り外し可能な仕切り取り付けることによって chamber 間の移動を制御できる。また新奇マウスの拘束および新奇物体として配置するグリッドゲージ (外寸：幅 100 mm、高さ 175 mm、室内：幅 70 mm、高さ 150 mm, BS-402260-02, BrainScience・idea) として、塩化ビニル製の床面と蓋が多数のステンレス棒 (直径 3 mm) により連結されている檻状のものを使用した。また、実験室周囲の物による影響を防ぐために、塩化ビニル製の高さ 400 mm の囲いに TEST CAGE を入れて実験を行った。

社会行動解析は、Habituation phase, Sociability phase, Social novelty phase の3段階により行った (図9)。まず Habituation phase では、各 chamber 間の仕切りを取り外し、左右両側の chamber に各1個ずつ空のグリッドゲージを設置した。その状態で、試験マウスを中央の chamber に置き、10分間、自由に3つの chamber を探索させた。次に、Socialbility phase では、各 chamber 間に仕切りを設置し、Habituation phase で設置した片側のグリッドゲージに新奇マウス (成体の ICR 雄マウス) を入れ、もう片側には空のグリッドケージを置いた (図9)。この状態で、試験マウスを中央の chamber に入れ、仕切りを外すのと同時にビデオでの記録を開始した。Social novelty phase では、Sociability phase において使用した新奇マウスを familiar マウスとして配置し、先程とは別の成体 ICR 雄マウスを新奇マウスとしてグリッドゲージに入れた。記録は、Sociability phase と同様、試験マウスを中央の chamber に入れ、仕切りを外すのと同時にビデオでの記録を行った。各マウスおよび phase の切り替え時には、70%エタノールを噴霧し、床面および壁面の清掃および乾燥を行った。

試験マウスの行動記録には、デジタルビデオカメラ (Handycam, HDR-PJ760, ソニー) を使用し、録画映像を見て計測項目の時間をマニュアルで測定した。計測項目は、各 phase における試験マウスの各 chamber での滞在時間を測定した。

### 3.6 電気生理学的解析

#### 切片の作製およびホールセル記録

電気生理学的解析は、東京大学の狩野方伸教授および広島大学の橋本浩一教授と中山寿子助教との共同研究で行い。切片の作製およびホールセル記録についてはすべて広島大学において解析をして頂いた。解析に用いたマウスは、7週齢から8週齢の L7-mTOR Tg マウスを用い、Control マウスとして同週齢の ICR (雌) × C57BL/6N (雄) の F1 (第一世代) を使用した。

小脳スライスの作製は、既に報告されている手法を用いて行った (Aiba *et al.*, 1994; Kano *et al.*, 1995)。具体的には、二酸化炭素により麻酔下の L7-mTOR Tg マウスおよび Control マウスを断頭し、素早く脳を摘出した。その後、95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> を通気しながら、冷却した人工脳脊髄液 (ACSF: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM glucose) に浸した状態で、vibratome slicer (VT1000S, ライカ) により厚さ 250 μm の parasagittal の小脳切片を作製した。切片作製後、ACSF 液中に 35 °C で 30 分間浸し、その後 25 °C で 6 時間浸した。

ホールセル記録は、正立顕微鏡 (BX50WI, オリンパス) を用いて小脳スライス上のプルキンエ細胞を視認しながら行った。パッチクランプアンプ (HEKA) により記録し、すべての記録は 32°Cの温度下において実施した。また、オンラインおよびオフラインにおけるデータ取得は、Patch Master software (HEKA) および Fit Master software (HEKA) を用いた。電流固定による電位記録 (current clamp recordings) では、ピペット内液に、125 mM K-methanesulfonate, 10 mM KCl, 5 mM NaCl, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM ATP, 0.4 mM GTP, 15 mM biocytin (pH 7.3) を使用した。ピペットを設置した後、すばやく静止膜電位を測定した。また、プルキンエ細胞における電気的な膜特性を評価するために、膜電位を-65 mV に固定した状態で過分極および脱分極する電流 (-500 pA から 1000 pA まで 100 pA 刻みに) を 700 ms 流した。発火頻度は、脱分極を起こさせる電流注入ごとに誘発されるスパイク数から算出した。入力抵抗は、-300 pA から-500 pA (100 pA 刻み) の電流注入時における電圧変動から平均抵抗値を算出した。電位固定による電流記録 (voltage clamp recording) では、ピペット内液に、50 mM CsCl, 10 mM Cs<sub>D</sub>-gluconate, 20 mM TEA-Cl, 20 mM BAPTA, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM ATP, 0.4 mM GTP, 30 mM HEPES, 15 mM biocytin (pH 7.3) を使用した。また、ACSF 液中に Picrotoxin を 100 μM 添加し、シナプス伝達阻害を行いながら記録

を行った。

刺激電極内は ACSF を充填し、矩形波による限局的な刺激 (刺激持続時間 : 0.1 ms, 振幅 : 0 V から 90 V) を行った。登上線維 (CF) への刺激には、パルスを 0.2 Hz で与え、刺激電極のピペットをプルキンエ細胞層にあるプルキンエ細胞の細胞体の周りを体系的に動かした。記録したプルキンエ細胞を神経支配している登上線維数は、徐々に刺激強度を増加させることで分離できた CF-EPSC の数により評価した。統計学的な評価は、Sigmaplot 12.5 software (Systat software) を用いて行った。

### 3.7 単一のプルキンエ細胞における形態解析

電気生理学的解析時に注入した biocytin に対して、Alexa-488 が結合した抗 avidin 抗体 (A21370, Invitrogen) を用いて免疫反応を行うことで、記録測定した各プルキンエ細胞を可視化した。具体的には、解析後の切片をブロッキング液 (3 % 正常ヤギ血清, 0.5 % TritonX-100 in PBS) に 1 時間、室温で浸した。ブロッキング後、抗 avidin 抗体 (2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) による免疫反応を 4 °C で一晩行った。免疫反応を行った切片は、wash 液 (PBS + 0.5 % Triton-X-100) で 10 分間、室温で 3 回

洗浄を行った後、PBSにより10分間、室温で洗浄した。洗浄後、切片をAPSコートスライドガラスに貼り付け、VECTASHIEDを用いて封入した。封入した切片を共焦点レーザー顕微鏡により観察した後、Image J (National Institutes of Health)により下記の三項目について定量を行った。Primary dendrite: プルキンエ細胞の細胞体より伸びる樹状突起の数をカウントした。Self-crossing: Lefebvreらのself-crossingの定量方法 (Lefebvre *et al.*, 2012) に倣い、プルキンエ細胞の細胞体から伸びる primary dendrite の第二分枝 (第一分枝をプルキンエ細胞の細胞体から伸びた直後の箇所として、その次に分枝した箇所) から第四分枝までの距離を基準に、一定面積における樹状突起の重なるの数をカウントした。具体的には、プルキンエ細胞の細胞体の中心から約 48  $\mu\text{m}$  離れた場所に一辺 62.84  $\mu\text{m}$  の正方形を作成し、その中の樹状突起の重なるの数をカウントした。Total area: 単一のプルキンエ細胞の細胞体から広がる樹状突起の面積を定量した。

### 3.8 子宮内エレクトロポレーション

*Cre* 遺伝子発現下においてのみ活性型 mTOR が発現する CAG-*loxP-stop-loxP*-active mTOR プラスミドは、同研究室の葛西秀俊先生より頂いた。また、 $\beta$ -actin-

Cre および  $\beta$ -actin-*loxP-stop-loxP*-EGFP プラスミドは、東京大学岡部繁男先生より頂いたものを使用した。

C57BL/6N 雌と DBA/2 雄の F1 雌マウス (日本クレア株式会社) と ICR 雄マウス (日本クレア株式会社) を交配させ、翌日プラグが付いた雌マウスの胎子を E0.5 とし、E11.5 から E12.5 の期間に第IV脳室へ子宮内エレクトロポレーションにより遺伝子導入を行った。活性型 mTOR を発現させる胎仔には、上記 3 種のプラスミドを同時に遺伝子導入し、コントロールとする胎仔には、活性型 mTOR を発現するプラスミド以外の 2 種を同時に遺伝子導入した。導入の際のパルス条件は、40 V, 50 msec on, 950 msec off, 5times で行い、Square Wave Electroporator (CUY21SC, Nepagene) および電極 (CUY650P3, Nepagene) を使用した。

P14 において、4 % PFA 溶液により灌流固定を行い、抗 GFP 抗体 (sc-101536, Santa Cruz) および抗 Calbindin 抗体により蛍光免疫組織染色により遺伝子導入されたプルキンエ細胞と遺伝子導入されていないプルキンエ細胞の観察を行った。プルキンエ細胞の細胞体の面積測定には Image J (National Institutes of Health) を用いた。

## 第4章 結果

### 4.1 小脳プルキンエ細胞特異的に活性型 mTOR を発現する Tg マウスの樹立

小脳プルキンエ細胞における mTORC1 経路の機能解析のため、小脳プルキンエ細胞において活性型 mTOR を発現する Tg マウスの作製を行った。本研究で用いた活性型 mTOR は、ラット mTOR 遺伝子配列中に 4 カ所点変異が導入されており、培養細胞において飢餓条件下においても活性化状態が維持される変異体である (Ohne *et al.*, 2008)。この恒常的活性化能は、mTORC1 経路特異的な亢進を引き起こし、mTORC2 経路の亢進は引き起こさないことが明らかとなっている。また、N 末端側には FLAG タグが付加されている。

まず、小脳プルキンエ細胞特異的にテトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (tTA) を発現する *L7-tTA/+* Tg マウスと、テトラサイクリン応答因子 (TRE) 下流に活性型 mTOR cDNA を連結した Tg マウス (*TRE-mTOR/+*) を交配することによって、*L7-tTA/+; TRE-mTOR/+* 二重 Tg マウスを得た (図 3)。さらに、これらの二重 Tg マウス同士を掛け合わせることによって、それぞれのトランスジェーンのコホモ接合型の Tg マウス系統 (*TRE-mTOR/TRE-mTOR ; L7-tTA/L7-tTA*) を

樹立した。以降の実験では、ホモ接合型の二重 Tg マウス同士を掛け合わせるこ  
とによって、系統の維持および解析用マウスの作製を行った。TRE-mTOR/TRE-  
mTOR ; L7-tTA/L7-tTA Tg マウスは、Dox によって活性型 mTOR の発現を制御す  
ることが可能である。本研究では、小脳プルキンエ細胞特異的に活性型 mTOR  
が発現している Dox 非投与群を L7-mTOR Tg マウスと呼ぶ。一方、親世代の交  
配開始時より Dox の投与を開始し、継続的に Dox 投与することによって活性型  
mTOR の発現を抑制した *TRE-mTOR/TRE-mTOR ; L7-tTA/L7-tTA Tg* マウス群を  
Control として用いた。

#### 4.2 L7-mTOR Tg マウスにおける活性型 mTOR の発現確認

小脳プルキンエ細胞における活性型 mTOR の発現時期を決定するために、1  
週齢から 6 週齢までの L7-mTOR Tg マウスおよび Control マウスから小脳を摘出  
し、ホモジナイズを行い、タンパク質懸濁液を調製した。得られたタンパク質サ  
ンプルを SDS-PAGE によって分離し、ウェスタンブロッティングを行った。そ  
の後、活性型 mTOR の N 末端に FLAG エピトープが融合していることを利用  
し、抗 FLAG 抗体を用いて活性型 mTOR の検出を行った。その結果、2 週齢か

ら 5 週齢の L7-mTOR Tg マウスのタンパク質サンプルにおいてのみ、活性型 mTOR と推測されるバンドが検出された (図 4)。特に、2 週齢から 4 週齢の L7-mTOR Tg マウスにおいて活性型 mTOR が多く発現していることが確認された。

2 週齢から 4 週齢にかけて L7-mTOR Tg マウスの小脳において、活性型 mTOR が多く発現していたことから、4 週齢の Control と L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞における mTORC1 シグナルの亢進を検証した。我々は、mTORC1 シグナル亢進の検証にあたり、mTORC1 の基質である S6 キナーゼに着目し、S6 キナーゼによってリン酸化される S6 の抗リン酸化抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、野生型マウスと比較して、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞では、リン酸化 S6 の強い陽性シグナルが検出された (図 5 A,B)。このことから L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞では mTORC1 シグナルの恒常的な亢進が起こっていることが示唆された。また、小脳以外の領域における mTORC1 シグナルの亢進を確認するため、4 週齢の Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスの大脳皮質および海馬領域においても抗リン酸化 S6 抗体による蛍光免疫組織染色を行ったが、Control と比較して顕著にシグナルが増大している領域は認められなかった (図 5 C)。

続いて、mTORC1 シグナル亢進の小脳形態への影響を検証するために、Control

マウスと L7-mTOR Tg マウスの成体 (12 週齢) を固定し、矢状断の切片の Nissl 染色を行った。その結果、Control マウスと比べて、L7-mTOR Tg マウスにおいては小脳が小さくなる傾向が見られた (図 5 D)。そこで、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞において、mTORC1 シグナルがより亢進していると考えられる 4 週齢のマウスの小脳の分子層の厚さを定量した。その結果、Control マウスと比較して、L7-mTOR Tg マウスでは有意にその厚さが減少していることが確認された (図 5 E)。

#### 4.3 L7-mTOR Tg マウスの行動解析

これまでに、小脳プルキンエ細胞で *Tsc1* 遺伝子を欠損させることで mTORC1 シグナルを亢進したノックアウトマウスにおいて、運動協調能の障害や自閉症様の社会性行動の異常と言った表現型を示すことが報告されている (Tsai *et al.*, 2012; Angliker *et al.*, 2015)。そこで、今回作製した Tg マウスについて、種々の行動解析を行うことにより、小脳プルキンエ細胞特異的に活性型 mTOR を発現させたことによる個体への影響を検証した。

まず、成熟前の 6 週齢の L7-mTOR Tg マウスおよび Control マウスを用いて、

ロータロッドテストにより運動協調と運動学習を解析した。その結果、各テスト日ごとの有意な差は認められなかったが、L7-mTOR Tg マウスは、5日間のテストを通して、Control マウスよりもロッドから落下するまでの時間が有意に短かった (図 6 A,  $p < 0.001$  by two-way ANOVA)。一方、L7-mTOR Tg マウスでもロッドから落下するまでの時間は試行回数を重ねるごとに長くなった。続いて、成熟後の 10 週齢の各マウスを用いて、同様のテストを行った。その結果、L7-mTOR Tg マウスでは試行日程が進んでもロッドに滞在する時間について、Control マウスほど時間の増加が見られなかった。また、テスト 2 日目および 4 日目において、L7-mTOR Tg マウスのロッドから落下するまでの時間は Control マウスと比較して有意に短くなっていることがわかり (day 2 :  $p < 0.05$ , day 4 :  $p < 0.01$  by two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test)、5日間のテスト全体についても有意な差が認められた (図 6 C,  $p < 0.001$  by two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test)。これらの結果から、成熟前の L7-mTOR Tg マウスは運動学習に大きな異常はまだ見られないが、運動協調には軽度の異常が生じたことが示唆された。成熟後には、運動学習および協調のどちらにおいても、異常があることが示唆された。なお、ロータロッドテストでは、一般的に体重の軽いマウスの方が体重の重いマウスに比べて、ロッドから落下するまでの

時間が長い傾向にある。成熟前では、ほぼ全ての個体において L7-mTOR Tg マウスは、Control マウスよりも体重が軽かった (図 6 B)。成熟後では、ほぼ同じ体重であった (図 6 D)。

L7-mTOR Tg マウスにおいて、運動協調に異常があることが示唆されたことから foot print により歩行の様子を視覚化し、検証することにした。ロータロッド後の 12 週齢の L7-mTOR Tg マウスおよび Control マウスの後肢の歩行を記録したところ、L7-mTOR Tg マウスの方が Control マウスに比べて、歩行の際に後肢を左右に開いて歩行していることがわかった (図 7)。

続いて、オープンフィールドテストによって、6 週齢から 7 週齢の L7-mTOR Tg マウスおよび Control マウスの新奇環境下での探索行動や情動行動について検証した。その結果、新奇環境での探索行動を示す総行動時間および総行動距離について、L7-mTOR Tg マウスは Control マウスと比較していずれも減少していることが明らかとなった (図 8 B, C)。一方で、フィールドの中央部と周辺部の滞在時間を比較しても、L7-mTOR Tg マウスを Control マウスとの間で有意な差は認められなかった (図 8 D)。また、これまでに報告されている自閉症様マウスでは、新奇環境下で不安様行動が多くなるために新奇環境 (オープンフィールド) での探索行動が減り、その結果、中心部を極端に避け、周縁部に留まる傾向

が見られている。しかしながら、L7-mTOR Tg マウスにおいては、自閉症様マウスで見られるような顕著な不安様行動を示さないことが示唆された。

社会的行動の測定として、6 週齢から 7 週齢の L7-mTOR Tg マウスおよび Control マウスを用いて、three chamber test を行った。three chamber test では、新奇マウスに対する興味を chamber での滞在時間を社会的な行動として評価した。Habituation phase では L7-mTOR Tg マウスと Control マウスの間に各 chamber への嗜好傾向の有意な差は認められなかった (図 9, Habituation phase)。続いて、Sociability phase では、新奇動物に対する有意な差は認められなかったが、L7-mTOR Tg マウスの方が Control マウスと比較して、新奇動物への興味が低い傾向にあった (図 9, Sociability phase)。最後に、Social novelty phase では、新奇マウスと既知マウスのいずれに興味を持つかを検証した。既知動物 (familiar) と比較した時に新奇動物 (novel) への興味の低下といった Tsai らの自閉症様のマウスで見られるような自閉症様な有意差は認められなかった。社会行動解析の結果から、本研究で作製した L7-mTOR Tg マウスではこれまでに報告されている自閉症のモデルマウスの表現型とは完全に一致しないことが明らかになった。

以上のことから、小脳特異的な活性化型 mTOR の発現により、運動協調能に異常が起きることが示唆された。また、運動協調能の低下がオープンフィールドテ

ストにおける探索行動時間および距離の減少に繋がるのではないかと考えられた。しかしながら、興味深いことに、mTOR シグナルの上流の遺伝子をノックアウトすることで、mTOR シグナルを亢進し自閉症モデルとした Tsai らのマウスに見られていたような不安様行動の増加や社会行動の異常といった表現型と比較すると、我々が作製した Tg マウスの表現型は一部異なる表現型があることがわかった。

#### 4.4 L7-mTOR Tg マウスの電気生理学的解析

小脳プルキンエ細胞特異的な活性化型 mTOR の発現により、顕著な運動協調異常が引き起こされていることから、mTORC1 シグナルの亢進に伴うプルキンエ細胞でのシナプス伝達などの変化を電気生理学的に調べた。電気生理学的解析には、7 週齢から 8 週齢の L7-mTOR Tg マウスおよび Control マウス (ICR × B6 の仔) を使用した。

まず、プルキンエ細胞の膜興奮性を検証した。静止膜電位は、Control マウスと L7-mTOR Tg マウスで差がなかった [表 1,  $V_{rest}$  ( $p = 0.359$  by t-test; L7-mTOR Tg,  $-54.4 \pm 1.6$  mV,  $n = 19$ ; Control,  $-52.8 \pm 0.9$  mV,  $n = 30$ )]. 一方、L7-mTOR Tg マウス

における入力抵抗は、Control マウスと比較して著しく低かった ( $p < 0.001$  by t-test; Tg,  $30.3 \pm 1.9 \text{ M}\Omega$ ,  $n = 24$ ; control,  $46.0 \pm 1.4 \text{ M}\Omega$ ,  $n = 29$ )。電流注入を行っていない状態の膜電位である自発的な発火を調べたところ、Control マウスのプルキンエ細胞では 67 % ( $n = 20/30$ ) 起こっていたのに対して、L7-mTOR Tg マウスではわずか 9 % ( $n = 2/22$ ) しか発火が起こっていなかった (表 1)。Control マウスにおいては、すべてのプルキンエ細胞が脱分極刺激に応答し、活動電位を発生させた。発火パターンは、すべてのプルキンエ細胞で均一に揃うことがないことが知られている (Kim *et al.*, 2012) が、一般的に、平均スパイク頻度は注入電流の強度に比例して増加する。ところが、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞においては、1000 pA を注入した際でも、わずか 25 % ( $n = 7/24$ ) しか活動電流を発生させなかった。また、L7-mTOR Tg マウスでは、著しい発火頻度の減少も見られた ( $p < 0.001$  by two-way repeated measures ANOVA; L7-mTOR Tg,  $n = 24$ ; Control,  $n = 30$ , 図 10 A)。これらのことから、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞では、膜興奮性が著しく低いことが示唆された。

次に、プルキンエ細胞における mTOR シグナルの恒常的な亢進が生後 3 週間の登上線維 (CF) によるプルキンエ細胞の神経支配にどのような影響を及ぼすか検証した。顆粒細胞層中の登上線維を刺激し、電位固定により excitatory

postsynaptic currents (EPSCs) を電流記録した。ほとんどの Control マウスにおいて、刺激強度を徐々に増加させても、CF-EPSC の振幅波形の本数は 1 本であった ( $n = 36/38$ , 図 10 B)。それとは反対に、L7-mTOR Tg マウスにおいては、73% のプルキンエ細胞で、刺激強度の増加に伴い CF-EPSC の振幅波形の本数が増加することが確認された ( $n = 16/22$ , 図 10 B)。Control マウスと L7-mTOR Tg マウス間で、EPSC スパイク数の分布が著しく異なることも明らかになった ( $p < 0.001$  by Mann-Whitney Rank Sum test, 図 10 B)。このことから、Control マウスのプルキンエ細胞は、単一の登上線維により支配されている (Hashimoto and Kano, 2003; Nakayama *et al.*, 2012) のに対し、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞は、複数の登上線維により神経支配されていることが示唆された。さらに、異常な神経支配に加えて、L7-mTOR Tg マウスの CF-EPSC のキネティクスにも影響を与えていることが示唆された。具体的には、L7-mTOR Tg マウスにおける CF-EPSC は Control と比較して、顕著に振幅が増大し ( $p < 0.001$  by Mann-Whitney Rank Sum test; Control,  $1605 \pm 70$  pA,  $n = 32$ ; L7-mTOR Tg,  $2745 \pm 185$  pA,  $n = 21$ )、立ち上がり時間 (rise time) は 10-90 %遅くなり ( $p < 0.001$  by Mann-Whitney Rank Sum test; Control,  $0.51 \pm 0.02$  ms,  $n = 32$ ; L7-mTOR Tg,  $0.62 \pm 0.03$  ms,  $n = 19$ )、減衰時間定数 (decay time constant) は短かった ( $p < 0.001$  by t-test; Control,  $8.89 \pm 0.22$  ms,  $n = 32$ ;

L7-mTOR Tg,  $8.08 \pm 0.31$  ms,  $n = 19$ ) が、paired-pulse ratio は正常のまま ( $p = 0.051$  by Mann-Whitney Rank Sum test; Control,  $0.71 \pm 0.01$ ,  $n = 32$ ; L7-mTOR Tg,  $0.67 \pm 0.02$ ,  $n = 21$ ) であった (表 2)。これらのことから、プルキンエ細胞における mTOR シグナルの恒常的な亢進は生後の発達期における単一神経支配の樹立に異常をもたらし、成体の登上線維からプルキンエ細胞へのシナプス伝達に著しい変化をもたらすことが示唆された。

これまでに L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞において、膜興奮性の減少および CF-EPSC の特性が変化していることが確認された。そこで、これらの変化が登上線維からの入力によるプルキンエ細胞の電位応答にどのような影響を与えるか検証した。-65 mV に電位固定した条件下で、各プルキンエ細胞に対して最も強い神経支配を行っている登上線維により誘発された EPSPs を計測した。Control マウスのプルキンエ細胞では、登上線維刺激により誘発される典型的な 1 本のオーバーシュートといくつかのスパイクレットから成る複雑スパイクが記録された。一方、L7-mTOR Tg マウスのほとんどのプルキンエ細胞では、スパイクレットを持たない 1 本の活動電位のみが記録された。スパイクおよびスパイクレットの平均数は、Control マウスのものと比較して L7-mTOR Tg マウスにおいて顕著に減少していた ( $p < 0.001$  by Mann-Whitney Rank Sum test; L7-mTOR

Tg,  $1.06 \pm 0.18$ ,  $n = 17$ ; Control,  $2.93 \pm 0.20$ ,  $n = 14$ , 図 10 C)。これらのことから、L7-mTOR Tg マウスでは、登上線維からプルキンエ細胞に入力された情報が、その後、プルキンエ細胞軸索から深部小脳核に適切に伝達されていない可能性が示唆された。このような伝達障害が、行動解析で見られた運動機能の障害に繋がったと考えられる。

#### 4.5 L7-mTOR Tg マウスにおける小脳プルキンエ細胞の形態

L7-mTOR Tg マウスにおいて、2 週齢から 4 週齢にかけて活性型 mTOR が多く発現していたが、その後、発現量は徐々に低下し、6 週齢ではほとんど検出されなかった。この現象がおそらくプルキンエ細胞の減少によるものであると推測し、我々は、実際にプルキンエ細胞数とその形態について調べた。3, 4, 6, 12 週齢の L7-mTOR Tg マウスの小脳切片を小脳プルキンエ細胞マーカーである抗 Calbindin 抗体を用いて蛍光免疫組織染色を行った。その結果、Control マウスと比較して、L7-mTOR Tg マウスでは、プルキンエ細胞の細胞体や樹状突起が肥大化していることが明らかになった (図 11 A)。また、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞数の経時変化を定量したところ、3 週齢以降 Control マウスと比較し

て有意にその数が減少していくことがわかり、6週齢で Control マウスのプルキンエ細胞の3割程度になることが明らかになった (図 11 B)。その後、12週齢の L7-mTOR Tg マウスにおいてもプルキンエ細胞がすべて脱落することはなく、一定数のプルキンエ細胞が残っていた。また、興味深いことに、本来プルキンエ細胞は横一列に整然と並んで形成されるが、L7-mTOR Tg マウスにおいては、プルキンエ細胞の局在が不均一になっていることが確認された。

mTORC1 シグナルの亢進に伴い L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞では、その形態に異常があることがわかった。そこで、単一のプルキンエ細胞の形態について検証することにした。電気生理学的解析を行った際に、記録した各プルキンエ細胞にビオサイチンを注入し、蛍光色素が結合したアビジンで小脳スライスを染色することにより、単一のプルキンエ細胞を観察した (図 12)。プルキンエ細胞の primary dendrite の数を計測したところ、Control マウスの primary dendrite は 80%以上が 1 本であった。一方、L7-mTOR Tg マウスでは 2 本以上の primary dendrite を持つプルキンエ細胞が半分以上存在し、4 本以上存在する細胞体も観察された (図 13 A)。L7-mTOR Tg マウスにおいて、primary dendrite 数の増加および登上線維の複数支配が見られたため、4週齢の Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスの登上線維を抗 vGluT2 抗体を用いて蛍光免疫組織染色した。

その結果、L7-mTOR Tg マウスでは、Control マウスの登上線維と比較して登上線維の伸長が半分程度で止まっていることが明らかになった (図 14)。

本来、プルキンエ細胞から伸びる樹状突起は各々が重なることを避け広がっていくことが知られている (self avoidance, Gibson *et al.*, 2014)。しかしながら、L7-mTOR Tg マウスでは Control マウスと比較して、複雑に重なり合っている部分や極端に樹状突起の分布が少ない部分が多々見受けられた (図 12)。そこで、樹状突起同士の重なりである self-crossing している箇所を一定面積当たり計測してみたところ、L7-mTOR Tg マウスでは Control マウスの 3 倍以上 self-crossing が起こっていることが明らかになった (図 13 B)。また、樹状突起の面積を定量した結果、L7-mTOR Tg マウスでは、有意に面積が減少していることがわかった (図 13 C)。これらのことから、小脳プルキンエ細胞において、mTORC1 シグナルがプルキンエ細胞や樹状突起のサイズ制御や形態形成に関与していることが示唆された。また、序文で述べたように、小脳プルキンエ細胞特異的 *Tsc1* 欠損マウスにおける mTOR シグナルの亢進が、プルキンエ細胞の肥大化および脱落を引き起こすことはすでに報告されている (Tsai *et al.*, 2012; Angliker *et al.*, 2015)。本研究において作製した L7-mTOR Tg マウスにおいても、同様の表現型を確認することができた。さらには、小脳プルキンエ細胞における mTORC1 シグナルの

亢進は、プルキンエ細胞の肥大化を引き起こし、self avoidance 機構の破綻に繋がることが示唆された。

#### 4.6 mTORC1 シグナル亢進による小脳プルキンエ細胞のアポトーシス

L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞数が経時的に減少していたことから、mTORC1 シグナルが亢進された小脳プルキンエ細胞における細胞数減少のメカニズムを調べた。活性型 mTOR が 2 週齢において、最も発現し、4 週齢において減少し始めることに着目し、4 週齢におけるプルキンエ細胞における細胞死に繋がるような各種マーカーによる検出を試みた。4 週齢において灌流固定した後、矢状断切片の蛍光免疫組織染色を行った。まず、抗 cleaved caspase 3 抗体 (CC3) を用いて、アポトーシスによる細胞死を検証した。その結果、Control マウスと比較して L7-mTOR Tg マウスにおいて、CC3 の免疫反応が顕著に増加していることが明らかとなった (図 15)。次に、L7-mTOR Tg マウスにおいて、酸化ストレスのマーカーである抗 heme oxygenase-1 (HO-1) 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。その結果、L7-mTOR Tg マウスにおいて有意に HO-1 の免疫反応が増加していることが確認された (図 15)。本研究に用いた活性型 mTOR をマウ

ス前脳および大脳皮質特異的に発現させたマウスモデル (Kassai *et al.*, 2014)において、mTORC1 シグナルの亢進により Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) の発現が変化することが報告されている。また、HIF1 は HO-1 を誘導することから (Lee *et al.*, 1997)、L7-mTOR Tg マウスにおいて、HIF1 $\alpha$  の発現について検証した。結果として、HO-1 同様に L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞において、HIF1 $\alpha$  の発現レベルが上昇していることが確認された (図 15)。

以上のことから、小脳プルキンエ細胞での mTORC1 シグナルの亢進は、酸化ストレスの影響下と類似した環境を生み出し、その結果、HIF1 シグナル依存的にプルキンエ細胞のアポトーシスによる脱落が起こっているということが示唆された。

#### 4.7 Rapamycin 投与による L7-mTOR Tg マウスプルキンエ細胞の肥大化および細胞死の抑制

L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞では、活性型 mTOR 発現により mTORC1 シグナルが亢進していることは、前述したリン酸化 S6 のシグナルが増加していたことから明らかである。そこで我々は、mTORC1 阻害剤である

rapamycin を用いて、mTORC1 シグナルが亢進していることの裏付けおよび mTORC1 シグナルの亢進を阻害することによる L7-mTOR Tg マウスで見られた表現型のレスキューを試みた。離乳期からプルキンエ細胞の脱落がほぼ起こりきっていた 6 週齢時期までの期間において、マウス腹腔内注射による rapamycin 投与を行った。投与期間終了後、プルキンエ細胞数およびその大きさについて定量を行ったところ、rapamycin 投与群の L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞数の減少およびプルキンエ細胞の細胞体の肥大化は、有意に抑制された (図 16)。Control マウスと比較すると、いずれの指標においても有意差はなく、mTORC1 がこれらの現象に強く関与していることが示唆された。

#### 4.8 子宮内エレクトロポレーション法による L7-mTOR Tg マウス表現型の再現

子宮内エレクトロポレーション法によって胎生期から活性型 mTOR を発現させることで別のアプローチによる mTORC1 シグナルの亢進とプルキンエ細胞数の肥大化の関連性について検証することを試みた。BDF1 メスマウスと ICR オスマウスを交配させ、E11.5 から E12.5 時期の胎仔の第四脳室に遺伝子を導入した。活性型 mTOR と EGFP を発現する 2 種のプラスミドを一緒に導入した群 [活

性型 mTOR (EGFP+/-) ] と Control として EGFP を発現するプラスミドだけを導入した群 (EGFP) を比較することにより、活性型 mTOR 発現に伴うプルキンエ細胞肥大化への影響を見た。活性型 mTOR (EGFP+) と EGFP のプルキンエ細胞の大きさを定量したところ、活性型 mTOR (EGFP+) のプルキンエ細胞の細胞体の面積が有意に大きくなっていた (図 17)。また、活性型 mTOR と EGFP を発現する 2 種のプラスミドを導入した個体内において、EGFP が陽性である [活性型 mTOR (EGFP+)] プルキンエ細胞と陰性である [活性型 mTOR (EGFP-)] プルキンエ細胞の大きさを比較してみたところ、同様に EGFP 陽性のプルキンエ細胞の細胞体の方が大きくなっていた。

以上のことから、L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞では、活性型 mTOR 発現により mTORC1 シグナル特異的に亢進が起こっていたこととまた小脳プルキンエ細胞数の減少や肥大化といった表現型が mTORC1 シグナルの亢進による現象であることが強く示唆された。

#### **4.9 HIF1 $\alpha$ 阻害剤 PX-478 による L7-mTOR Tg マウス表現型の原因シグナル経路解明**

これまでの結果から、活性型 mTOR の発現により mTORC1 シグナルが亢進することでプルキンエ細胞数の減少や肥大化といった現象が引き起こされていると考えられる。プルキンエ細胞がアポトーシス細胞死を引き起こしていることを明らかにした際に、mTORC1 シグナルの下流に存在する HIF1 $\alpha$  の発現が増加していた。そこで、我々は、HIF1 $\alpha$  に着目し、HIF1 $\alpha$  阻害剤である PX-478 投与を行うことで、より詳細な分子メカニズム解明を目指した。PX-478 は、HIF1 $\alpha$  の酵素依存的な分解に必要である還元酵素チオレドキシンを阻害することにより HIF1 のトランス活性化を阻害する。PX-478 の投与時期については、ラパマイシン投与の時と同様に、3 週齢から 6 週齢の L7-mTOR Tg マウスに行った。その結果、L7-mTOR Tg マウスの小脳分子層で見られたような分子層の異常やプルキンエ細胞の肥大化が抑制された (図 18)。生存しているプルキンエ細胞数およびその細胞体のサイズを定量したところ、Control マウスほどまでは抑制されなかったが、細胞数およびサイズの両方について一定の効果が見られた。これらのことから、L7-mTOR Tg マウスで見られた表現型には mTORC1 経路の中でも HIF1 に繋がる経路の寄与が強く示唆され、小脳における mTORC1-HIF1 $\alpha$  経路が正常な小脳発生およびプルキンエ細胞周辺の発達に関わっていることが示唆された。

## 第5章 考察

### 5.1 他の mTORC1 シグナル亢進 Tg マウスとの比較

mTOR シグナルは、タンパク質合成やエネルギー代謝、遺伝子発現の制御、脂質合成などに関与している。特に神経系において、mTOR シグナルの異常は、自閉症やてんかん、神経変性疾患といった様々な疾患に繋がることが知られている。小脳において、mTOR シグナルの異常を起こさせたマウスモデルはこれまでにいくつか報告されている。例えば、mTORC1 の上流遺伝子の *Tsc1* もしくは *Tsc2* 遺伝子や *Pten* 遺伝子を小脳プルキンエ細胞特異的にノックアウトし、mTORC1 シグナルを亢進した Tg マウス (Cupolillo *et al.*, 2016; Reith *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2012) である。これらの Tg マウスでは、小脳プルキンエ細胞の肥大化や脱落、そしてマウスの運動機能に異常が見られるといった表現型が確認されている。また、*Tsc1* もしくは *Tsc2* ノックアウトマウスでは、社会行動に異常が見られ、新奇マウスに対する興味が失われ、自閉症様のモデルマウスとされている。このような報告から、今回我々が作製した小脳プルキンエ細胞特異的に活性型 mTOR を発現させた L7-mTOR Tg マウスにおいても、同様の表現型が見られることが

予想された。実際に、小脳プルキンエ細胞の肥大化や脱落が観察され、先行研究において報告された表現型と一致していた (図 11, 12)。行動解析を行ったところ、運動機能の異常は確認された (図 6, 7)。一方で、社会行動解析の **Sociability phase** において、L7-mTOR Tg マウスと Control マウス間に有意な差はなかったが、新奇動物への興味が低い傾向が見られた (図 9)。Tsai らの *Tsc1* ノックアウトを行った自閉症モデルマウスでは、**Sociability phase** において、新奇動物への興味が低いことが確認されている。直接 mTORC1 シグナルを亢進した L7-mTOR Tg マウスよりも、*Tsc1* ノックアウトによる間接的な mTOR シグナルの亢進の方が顕著な自閉症様行動を示したことは大変興味深く、mTORC1 シグナル以外のシグナルが自閉症発症に関与している可能性があるのではないだろうか。例えば、TSC1 および 2 を制御するシグナルとして LKB1-AMPK-mTOR シグナルがあり、AMPK は同時に mTORC1 構成因子である Raptor をリン酸化し、抑制する経路も存在する (Shackelford and Shaw, 2009)。このような経路の存在により、Tsai らのモデルマウスは結節性硬化症の原因となる変異を再現している点では優れているが、mTORC1 シグナルの関与を考察する上では、本研究で用いた L7-mTOR Tg マウスの方が特異性が高いと考えられる。

また、興味深いことに、mTORC1 シグナルを欠損させた Tg マウスにおいても

プルキンエ細胞の肥大化および脱落、社会行動の異常が見られた (Angliker *et al.*, 2015)。Angliker らは、mTORC1 の構成タンパク質である *Raptor* および mTORC2 の構成タンパク質である *Rictor* を小脳プルキンエ細胞特異的にノックアウト (それぞれ RAPuKO, RIPuKO マウスと呼称) することで、mTORC1 あるいは mTORC2 シグナルを欠損させた。これらの Tg マウスのうち、RAPuKO においてのみ、プルキンエ細胞の脱落や社会行動の異常といった表現型が観察されている。Tsc1 の Tg マウスや RAPuKO マウスのプルキンエ細胞の脱落は、L7-mTOR Tg マウスと比較して、週齢が進んでから起こっていた。L7-mTOR Tg マウスでは、3 週齢頃から脱落が見られた (図 11 B) のに対して、前述した Tg マウスでは、比較的高齢なマウス (RAPuKO : 11 週齢以上、Tsc1 ノックアウト : 8 週齢で観察) においてのみ観察された。また、mTOR シグナルを欠損させた RAPuKO マウスや RIPuKO マウスでは、どちらもプルキンエ細胞が退縮することが確認されおり、L7-mTOR Tg マウスで見られたような肥大化は mTORC1 シグナル亢進による影響が強く示唆された。

今回、L7-mTOR Tg マウスにおいて見られたような表現型は、運動機能、社会行動の異常についてのみ比較するならば、L7-mTOR Tg マウスは mTORC2 シグナルを欠損させた RIPuKO マウスに表現型が近かった。RIPuKO マウスでは、若

い時期 (4-8 週齢) において運動機能に異常が見られているが、社会行動の異常は高齢期に至っても観察されていなかった。mTORC1 シグナルの亢進は、mTORC2 シグナルを負に制御することが知られていることから、L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞において、mTORC2 シグナルが低下した可能性が考えられる。今後、L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞において、mTORC2 シグナルの低下が引き起こされているかどうかの検証を行い、mTORC1 シグナルの恒常的な亢進のみの表現型であったのか、あるいは mTORC1 シグナル亢進に伴う mTORC2 シグナルの抑制が L7-mTOR Tg マウスの表現型に寄与したのか検証したいと考えている。

L7-mTOR Tg マウスと Tsai らの小脳プルキンエ細胞特異的に *Tsc1* ノックアウトした Tg マウスとの表現型の差は、おそらく、mTORC1 シグナルを亢進させるために直接 mTOR を活性化させたか、あるいは上流の抑制因子を欠損させることで間接的に亢進させたかの差だと推察される。*Tsc1* ノックアウトによる mTORC1 シグナルの亢進は、negative feed back 機構によりいくらかのシグナル低下が考えられる。しかしながら、活性型 mTOR を発現させた mTORC1 シグナルの亢進では、negative feed back 機構によるシグナル低下の影響は受けにくい。このことにより、L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞では、劇的かつ迅速

的な変化を起こさせ、幼齢期からプルキンエ細胞の肥大化、脱落を引き起こしたと考えられる。一方で、予測されたような社会行動が見られなかったことについては、mTORC1 シグナル以外のシグナルが関与している可能性が考えられる。すでに、*Tsc1* が *Tsc2* や mTORC1 シグナルとは独立した制御を行っている報告もある (Thien *et al.*, 2015)。

*Tsc1* ノックアウトマウスは結節性硬化症の原因遺伝子に変異を入れることで、結節性硬化症に伴う自閉症の再現には優れているが、mTORC1 シグナルの関与を考察する点においては活性型 mTOR を発現させた L7-mTOR Tg マウスの方が特異性の高いモデルマウスになったと考えられる。また、mTOR シグナルの活性化の程度についても各マウスにおいて異なることが考えられる。また、L7-mTOR Tg マウスの表現型が *Tsc1* ノックアウトマウスよりも早期発現することにも見られるように各マウスにおける mTOR シグナルの亢進の程度が異なることが考えられる。先述した negative feed back 機構や *Tsc1* や *Tsc2* 独自の制御機構が示唆される中、L7-mTOR Tg マウスの mTORC1 シグナルの亢進は活性型 mTOR の発現量に依存するが、*Tsc1* ノックアウトマウスでは、内在性の mTOR シグナル因子の発現量に依存する。そのため、*Tsc1* ノックアウトマウスでは、mTORC1 シグナルの亢進が時期により大きく変動することが考えられる。さらに、ヒトの結

節性硬化症は、神経細胞における *TSC1/2* の loss of heterozygosity、あるいはハプロ不全による発症と考えられており、その点からも患者によって mTOR シグナルの亢進の度合いが違ふことが示唆されている。以上のことから、本研究の小脳プルキンエ細胞特異的に活性型 mTOR を発現させ、mTORC1 シグナルの亢進を行った Tg マウスモデルは、小脳の mTORC1 シグナルの機能解明において非常に重要な役割を持つだろう。今後、このモデルマウスを用いて、mTORC1 シグナルが亢進している精神疾患や神経変性疾患などの治療薬の候補となる化合物のスクリーニング等に使用することも期待できると考えている。

## 5.2 小脳プルキンエ細胞のアポトーシス細胞死

神経系において、Tang らは、mTOR 中の FRB ドメインにアミノ酸置換 (S2305T) を導入することで mTOR シグナルを亢進し、mTOR シグナルの亢進が細胞死を抑制していることを突き止めた (Tang *et al.*, 2014)。一方で、mTOR シグナルが低下すると、アポトーシスによる細胞死や酸化ストレス経路の悪化などが引き起こされる (Chen *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2010)。しかしながら、興味深いことに、我々が作製した L7-mTOR Tg マウスでは、mTORC1 シグナルの亢進が

起っているにも関わらず、小脳プルキンエ細胞のアポトーシス細胞死が観察された (図 15)。mTORC1 シグナルの亢進に付随する現象として、低酸素誘導因子である HIF1 $\alpha$  を誘導することが知られている (Land and Tee, 2007)。また、活性型 mTOR と HIF1 $\alpha$  の関連は、我々の研究室において、*Emx1* プロモーターを用いて胎生 10 日 (E10) から背側の終脳で活性型 mTOR を発現させた *Emx1*-mTOR Tg マウスで見られている。この *Emx1*-mTOR Tg マウスでは、胎生期の有糸分裂期にある神経前駆細胞において、mTORC1 シグナル亢進により HIF1 $\alpha$  の誘導およびアポトーシス細胞死が観察された (Kassai *et al.*, 2014)。一方で、*CaMKII* プロモーターを用いて胎生後期から興奮性ニューロンで活性型 mTOR を発現させた *CamKII*-mTOR Tg マウスでは、有糸分裂が終了している P12 の大脳皮質の神経細胞でアポトーシス細胞死は検出されなかった。このことは、mTORC1 シグナルの恒常的な亢進は有糸分裂が終了した細胞にアポトーシスを誘導しないことを示唆している。低酸素条件下では、*HIF1 $\alpha$*  遺伝子発現の上昇が起り、*HIF1 $\alpha$*  下流の p53 や p21、Bcl-2 といった標的因子の発現を制御することで、細胞のアポトーシス細胞死に繋がる (Carmeliet *et al.*, 1998)。*Emx1*-mTOR Tg マウスと同様に、*L7*-mTOR Tg マウスにおいても HIF1 $\alpha$  の発現上昇が予測され、実際に肥大化したプルキンエ細胞において HIF1 $\alpha$  の発現上昇が見られた (図

15)。このことから、mTORC1 シグナル亢進に伴う低酸素状態がプルキンエ細胞の脱落に繋がることが示唆された。

また、L7-mTOR Tg マウスと同様に小脳プルキンエ細胞の肥大化および脱落が見られているプルキンエ細胞特異的 *Tsc1* ノックアウトマウス (Tsai *et al.*, 2012) において、プルキンエ細胞の脱落に際して、酸化ストレスの増加が確認されていた。そこで、L7-mTOR Tg マウスにおいても酸化ストレスマーカーである HO-1 の検出を行ったところ、L7-mTOR Tg マウスの肥大化したプルキンエ細胞特異的に反応が検出された (図 15)。HO-1 は、ミクロソームに局在する膜酵素で、酸化ストレスに応答して、ヘム 1 分子から等量のビリベルジン、CO、遊離 Fe イオンを産生し、酸化ストレスから細胞を保護する機能を果たしている (Gozzelino *et al.*, 2010)。また、HIF1 が HO-1 を誘導していることも知られて (Lee *et al.*, 1997) おり、mTORC1 シグナルの亢進により、L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞が低酸素状態と似たような環境になり、酸化ストレスを受けていたと推察される。

小脳プルキンエ細胞は、胎生 10 日 (E10) から 13 日 (E13) 頃に発生すると考えられており、その後、P20 頃までに成熟することが知られている (Miale *et al.*, 1961; Apps and Hawkes, 2009)。我々の研究室において、これまでに作製された

mTORC1 シグナルが亢進した Tg マウスと比較して見ると、mTORC1 シグナルは細胞分裂期において、特に重要な役割を持つことが考えられる (Kassai *et al.*, 2014)。Emx1-mTOR Tg マウスでは、幼少期における mTORC1 シグナル亢進は、神経前駆細胞などの未熟な神経細胞において、酸化ストレスに曝された状態と類似した環境を生み出すと考えられる。また、大脳皮質において活性型 mTOR を発現させた CaMK II -mTOR Tg マウス (P21) では、活性型 mTOR の発現は確認されたが、HO-1 の発現は見られなかった。このことから、おそらく mTORC1 シグナルの亢進だけでは、酸化ストレスに似た状況を生み出すことはないと考えられる。これらのことから、細胞分裂や成長が活発な時期の神経細胞においてのみ、酸化ストレスに耐えることができない細胞は脱落、細胞死を起こし、耐えられた細胞は mTORC1 シグナルの亢進により異常な細胞成長を遂げ、肥大化したと考察される。

序論でも述べたように、L7-mTOR Tg マウスにおいても、mTORC1 シグナルが亢進することにより、mTOR シグナルに negative feed back 機構が働いていると考えられる。L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞では、negative feed back 機構により PDK1-Akt 経路あるいは mTORC2 経路の活性が下がり、アポトーシスに耐えることができずに細胞死が起こったのではないだろうか。これは、腫瘍細

胞では PI3K-Akt 経路に過剰な亢進が起こり、活性型 Akt により回避する機構が存在することが知られているからである (Frank *et al.*, 2003)。また、興味深いことに、Akt の活性化による抗アポトーシス機構は、酸化ストレスに対して脆弱であることが知られており (Nogueira *et al.*, 2008)、mTORC2 シグナル亢進による機構では、今回見られたような小脳プルキンエ細胞における酸化ストレスが原因のアポトーシスは防げなかったと推測される。以上のことから、L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞は、酸化ストレスあるいは酸化ストレスと類似の環境に曝されたことによりアポトーシスが起き、その環境に耐えたプルキンエ細胞のみが mTORC1 シグナル亢進による過度なタンパク質合成の影響により肥大化したと考えられる。

### 5.3 登上線維によるプルキンエ細胞の複数支配

L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞で見られたような形態の変化は、シナプス特性の変化に繋がる。Tsc1 あるいは Tsc2 をラット海馬ニューロンにおいて欠損させ mTORC1 シグナルを亢進させると、細胞体サイズの増加と興奮性の樹状突起スパインの形成が著しく阻害されていた (Tavazoie *et al.*, 2005)。L7-

mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞における興奮性の低下は、Input resistance の差による影響であることも考えられることから、マイナスの電流注入により過分極させた際の挙動について検討する必要があるだろう。小脳プルキンエ細胞においても mTORC1 シグナルの亢進は、シナプス特性に影響を与えることが推測され、登上線維からのプルキンエ細胞への投射が変化していることが予想された。L7-mTOR Tg マウスでは、プルキンエ細胞が複数の登上線維により神経支配を受け、CF-EPSCs の振幅が増加していた (図 10 B)。一方で、プルキンエ細胞特異的に *Tsc1* をノックアウトした Tsai らの Tg マウスでは、複数の登上線維による神経支配は起きておらず、EPSCs が減少傾向にはあるものの有意差はなかった (Tsai *et al.*, 2012)。興味深いことに、Anglikar らが作製した *Rictor* を小脳プルキンエ細胞特異的にノックアウトしたマウスである RIPuKO において、L7-mTOR Tg マウスと同様の複数支配が起きていたが、EPSCs の振幅は減少していた。このような L7-mTOR Tg マウスと RIPuKO マウスとの表現系の一致は、mTOR シグナルの negative feed back 機構によるものであることが考えられる。

幼若期のプルキンエ細胞は、複数の登上線維により多重支配を受けている。成長に伴い、プルキンエ細胞は投射している複数の登上線維の中で、最もシナプス結合の強い単一の登上線維の支配を受けることが知られている。しかしながら、

L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞は、電気生理学的解析により単一の登上線維支配ではなく、多重支配を受けていることがわかった (図 10 B)。興味深いことに、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞に投射している登上線維の数の分布と L7-mTOR Tg マウスの primary dendrite 数 (図 13 A) の分布が類似していた。さらに、登上線維の蛍光免疫組織染色 (図 14) の結果から、primary dendrite 付近に多数の陽性シグナルが見受けられた。このことから、電気生理学的解析において登上線維の多重支配と考えられた結果は、成長期における登上線維の刈り込み異常だけでなく、primary dendrite 数の増加も関与していると考えられる。L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞では、刈り込みの異常と primary dendrite 数の増加によって、一つのプルキンエ細胞に投射する登上線維数が増加し、登上線維の多重支配に繋がったのではないだろうか。

L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞は、著しく膜興奮性が低かった (図 10 A)。このような表現型は、Tsai らの *Tsc1* ノックアウトマウスにおいても見られている。*Tsc1* ノックアウトマウスや RIPuKO マウスでは運動機能に障害があることから、mTORC1 シグナルの強い亢進はプルキンエ細胞において、幼少期の登上線維の刈り込み異常を引き起こすことが示唆される。また、プルキンエ細胞のシナプス特性の変化が正常な運動機能の維持に重要な役割を果たしているこ

とが示唆される。

#### 5.4 self-crossing との関連性について

樹状突起の形成や維持の異常は、様々な神経疾患に関与していることが報告されている。mTOR シグナルとの関連は、mTORC2 シグナルを欠損させた RIPuKO マウスにおいて、self avoidance の異常による self crossing が観察されている (Angliker *et al.*, 2015)。また、これまでに、海馬ニューロンを用いた研究において、mTORC1 シグナルが樹状突起の分枝や crossing に関与していることが報告されている。mTORC1 シグナルの亢進した海馬ニューロン細胞は、樹状突起の分枝や crossing 数が増え、逆に mTORC1 シグナルを抑制されたニューロン細胞では、樹状突起の分枝や crossing 数の減少が観察されている (Urbanska *et al.*, 2012; Jaworski *et al.*, 2005)。海馬ニューロンにおける mTORC1 シグナルの役割を踏まえると、小脳プルキンエ細胞における樹状突起の分枝にも mTORC1 シグナルが強く関与していることが推測される。これらのことから、マウス小脳プルキンエ細胞においても PI3K-Akt-mTORC1 経路の亢進や mTORC2 活性化に伴う Akt のリン酸化活性は正常な樹状突起形成およびその維持に重要であることが考え

られる。L7-mTOR Tg マウスにおける self crossing の著しい増加は、mTORC1 シグナル亢進に伴う mTOR シグナル全体への negative feed back による影響が考えられる。L7-mTOR Tg マウスでは、前述したように恒常的に mTORC1 シグナルが亢進されており、その影響により内在性の mTORC2 シグナルの低下が引き起こされていると推測される。しかしながら、mTORC1 シグナルは、活性型 mTOR の発現によって、恒常的にシグナルが亢進状態になっているため、negative feed back 機構による mTORC1 シグナルへの負の制御機構の影響は少ない。一方で、mTORC2 シグナルは常に負に制御されている状態になっているために、このような表現型が見られたと考えられる。L7-mTOR Tg マウスでは、mTORC1 シグナルの亢進による過剰な樹状突起の分枝が引き起こされ、self avoidance による樹状突起同士の忌避制御以上の self crossing が引き起こされたと推察される(図 13 B)。これらのことから、mTORC1 シグナルの亢進による mTORC1 および mTORC2 シグナルのバランス崩壊が、プルキンエ細胞より派生する樹状突起の形成に影響を与えたことが示唆された。

## 5.5 mTORC1-HIF1 経路の関与について

HIF1 $\alpha$  阻害剤である PX-478 の作用点およびその特異性については、未だ不明な点が多い。今後の研究において、PX-478 が HIF1 $\alpha$  特異的に阻害しているかどうかについて、他の HIF1 $\alpha$  阻害剤を用いた実験を行いたいと考えている。それにより、本研究において示唆された mTORC1-HIF1 $\alpha$  経路とプルキンエ細胞の細胞体の肥大化や減少、運動失調などの表現型との関連を明確にしていく必要があると考えている。

今後、子宮内エレクトロポレーション法により、活性型 mTOR を発現させた個体において、同時に mTORC1 構成因子である Raptor をノックダウンすることで、L7-mTOR Tg マウスで見られたプルキンエ細胞の細胞体の肥大化や減少がレスキューされるかどうか検証したいと考えている。これにより、L7-mTOR Tg マウスで見られる表現型が mTORC1 シグナル依存的な cell-autonomous な現象なのかあるいは non cell-autonomous な現象であるのか検証できると考えている。また、mTORC2 構成因子である Rictor をノックダウンすることにより、mTORC2 シグナルの関与についても検証することができると考えている。

## 第6章 謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官の東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター動物資源学部門の饗場篤教授より丁寧かつ熱心な御指導、御助言を賜りました。心より厚く御礼申し上げます。

また実験の実施にあたり御指導、御助言を賜りました同研究室の中尾和貴准教授、中尾晴美助教、河野宏光助教に心より感謝の意を表します。

東京大学分子細胞生物学研究所高難度蛋白質立体構造解析センター膜蛋白質解析分野の前田達哉准教授より活性型 mTOR を贈与して頂き、今心より厚く御礼を申し上げます。

東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻生理学講座神経生理学分野の狩野方伸教授、広島大学医歯薬保健学研究院神経生理学教室の橋本浩一教授、同教室の中山寿子助教には、電気生理学的な解析をするにあたり、解析およびその解説をして頂き、心より厚く御礼を申し上げます。

東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻生理学講座の渡邊貴樹特任助教には、小脳への子宮内エレクトロポレーション法実施にあたり、数多くの御指導、御助言を賜りました。この場をお借りして、心より御礼を申し上げます。

動物資源学領域の後藤さん、工藤さん、玉野さんにはマウス凍結卵の移植など大変お世話になりました。心より御礼申し上げます。また、動物資源学研究室の川本くんと内藤さんにはマウス管理や試薬準備等を手伝い頂き、心より感謝致します。

最後に、同研究室の葛西秀俊准教授に心より厚く御礼申し上げます。研究技術に関することから海外研究室との交流の際のことまで、数多くの場面で大変お世話になりました。時に厳しく、時に優しく御指導、御助言を賜り、研究に対する向き合い方や研究の楽しさ、辛さを学ばせて頂きました。この場をお借りして心より御礼申し上げます。

## 第 7 章 参考文献

Allen, A.S., Berkovic, S.F., Cossette, P., Delanty, N., Dlugos, D., Eichler, E.E., Epstein, M.P., Glauser, T., Goldstein, D.B., Han, Y., *et al.* (2013). De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature* *501*, 217-221.

Amaral, D.G., Schumann, C.M., and Nordahl, C.W. (2008). Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci* *31*, 137-145.

Angliker, N., Burri, M., Zaichuk, M., Fritschy, J.M., and Rüegg, M.A. (2015). mTORC1 and mTORC2 have largely distinct functions in Purkinje cells. *Eur J Neurosci* *42*, 2595-2612.

Apps, R., and Hawkes, R. (2009). Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. *Nat Rev Neurosci* *10*, 670-681.

Auerbach, B.D., Osterweil, E.K., and Bear, M.F. (2011). Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature* 480, 63-68.

Bagni, C., and Greenough, W.T. (2005). From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci* 6, 376-387.

Banerjee, P., Ahmad, M.F., Grove, J.R., Kozlosky, C., Price, D.J., and Avruch, J. (1990). Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8550-8554.

Bauman M, Kemper TL. (1985). Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology*. 35, 866-74.

Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., and Hall, M.N. (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 10, 868-880.

Bourgeron, T. (2009). A synaptic trek to autism. *Curr Opin Neurobiol* 19, 231-234.

Bové, J., Martínez-Vicente, M., and Vila, M. (2011). Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nat Rev Neurosci* 12, 437-452.

Caccamo, A., Maldonado, M.A., Majumder, S., Medina, D.X., Holbein, W., Magrí, A., and Oddo, S. (2011). Naturally secreted amyloid-beta increases mammalian target of rapamycin (mTOR) activity via a PRAS40-mediated mechanism. *J Biol Chem* 286, 8924-8932.

Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., *et al.* (1998). Role of HIF1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394, 485-490.

Chen, L., Xu, B., Liu, L., Luo, Y., Yin, J., Zhou, H., Chen, W., Shen, T., Han, X., and Huang, S. (2010). Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPKalpha leading to apoptosis of neuronal cells. *Lab Invest* 90, 762-773.

Choi, K.C., Kim, S.H., Ha, J.Y., Kim, S.T., and Son, J.H. (2010). A novel mTOR activating protein protects dopamine neurons against oxidative stress by repressing autophagy related cell death. *J Neurochem* *112*, 366-376.

Crino, P.B., Nathanson, K.L., and Henske, E.P. (2006). The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med* *355*, 1345-1356.

Cupolillo, D., Hoxha, E., Faralli, A., De Luca, A., Rossi, F., Tempia, F., and Carulli, D. (2016). Autistic-Like Traits and Cerebellar Dysfunction in Purkinje Cell PTEN Knock-Out Mice. *Neuropsychopharmacology* *41*, 1457-1466.

Di Nardo, A., Wertz, M.H., Kwiatkowski, E., Tsai, P.T., Leech, J.D., Greene-Colozzi, E., Goto, J., Dilsiz, P., Talos, D.M., Clish, C.B., *et al.* (2014). Neuronal Tsc1/2 complex controls autophagy through AMPK-dependent regulation of ULK1. *Hum Mol Genet* *23*, 3865-3874.

Dibble, C.C., Asara, J.M., and Manning, B.D. (2009). Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol Cell Biol* 29, 5657-5670.

Dindot, S.V., Antalffy, B.A., Bhattacharjee, M.B., and Beaudet *et al.* (2008). The Angelman syndrome ubiquitin ligase localizes to the synapse and nucleus, and maternal deficiency results in abnormal dendritic spine morphology. *Hum Mol Genet* 17, 111-118.

Ding, X.F., Gao, X., Ding, X.C., Fan, M., and Chen, J. (2016). Postnatal dysregulation of Notch signal disrupts dendrite development of adult-born neurons in the hippocampus and contributes to memory impairment. *Sci Rep* 6, 25780.

Dorrello, N.V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N.H., Sherman, N.E., and Pagano, M. (2006). S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 314, 467-471.

Ehninger, D., Han, S., Shilyansky, C., Zhou, Y., Li, W., Kwiatkowski, D.J., Ramesh, V., and Silva, A.J. (2008). Reversal of learning deficits in a Tsc2<sup>+/-</sup> mouse model of tuberous sclerosis. *Nat Med* 14, 843-848.

Fenton, T.R., and Gout, I.T. (2011). Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 43, 47-59.

Franke, T.F., Hornik, C.P., Segev, L., Shostak, G.A., and Sugimoto, C. (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22, 8983-8998.

Gangloff, Y.G., Mueller, M., Dann, S.G., Svoboda, P., Sticker, M., Spetz, J.F., Um, S.H., Brown, E.J., Cereghini, S., Thomas, G., *et al.* (2004). Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Mol Cell Biol* 24, 9508-9516.

Gao, Z., van Beugen, B.J., and De Zeeuw, C.I. (2012). Distributed synergistic plasticity and cerebellar learning. *Nat Rev Neurosci* 13, 619-635.

García-Martínez, J.M., and Alessi, D.R. (2008). mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* 416, 375-385.

Garey, L.J., Ong, W.Y., Patel, T.S., Kanani, M., Davis, A., Mortimer, A.M., Barnes, T.R., and Hirsch, S.R. (1998). Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65, 446-453.

Gingras, A.C., Gygi, S.P., Raught, B., Polakiewicz, R.D., Abraham, R.T., Hoekstra, M.F., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 13, 1422-1437.

Gozzelino, R., Jeney, V., and Soares, M.P. (2010). Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 323-354.

Graff, J.R., and Zimmer, S.G. (2003). Translational control and metastatic progression: enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs. *Clin Exp Metastasis* 20, 265-273.

Harrington, L.S., Findlay, G.M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N.R., Cheng, S., Shepherd, P.R., *et al.* (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol* 166, 213-223.

Harrington, L.S., Findlay, G.M., and Lamb, R.F. (2005). Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci* 30, 35-42.

Hashimoto, K., Ichikawa, R., Kitamura, K., Watanabe, M., and Kano, M. (2009). Translocation of a "winner" climbing fiber to the Purkinje cell dendrite and subsequent elimination of "losers" from the soma in developing cerebellum. *Neuron* 63, 106-118.

Hashimoto, K., and Kano, M. (2003). Functional differentiation of multiple climbing fiber inputs during synapse elimination in the developing cerebellum. *Neuron* 38, 785-796.

Hentges, K.E., Sirry, B., Gingeras, A.C., Sarbassov, D., Sonenberg, N., Sabatini, D., and Peterson, A.S. (2001). FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13796-13801.

Herbert MR, Ziegler DA, Makris N, Filipek PA, Kemper TL, Normandin JJ, Sanders HA, Kennedy DN, Caviness VS Jr. (2004). Localization of white matter volume increase in autism and developmental language disorder. *Ann Neurol* 55, 530-40.

Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., and Guan, K.L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J* 27, 1919-1931.

Ito, M. (2001). Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev* 81, 1143-1195.

Jaworski, J., Spangler, S., Seeburg, D.P., Hoogenraad, C.C., and Sheng, M. (2005). Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* 25, 11300-11312.

Julien, L.A., Carriere, A., Moreau, J., and Roux, P.P. (2010). mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol* 30, 908-921.

Kano, M., Hashimoto, K., Chen, C., Abeliovich, A., Aiba, A., Kurihara, H., Watanabe, M., Inoue, Y., and Tonegawa, S. (1995). Impaired synapse elimination during cerebellar development in PKC gamma mutant mice. *Cell* 83, 1223-1231.

Kano, M., Hashimoto, K., Kurihara, H., Watanabe, M., Inoue, Y., Aiba, A., and Tonegawa, S. (1997). Persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking mGluR1. *Neuron* 18, 71-79.

Kano, M., Hashimoto, K., Watanabe, M., Kurihara, H., Offermanns, S., Jiang, H., Wu, Y., Jun, K., Shin, H.S., Inoue, Y., *et al.* (1998). Phospholipase cbeta4 is specifically involved in climbing fiber synapse elimination in the developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15724-15729.

Kasai, H., Sugaya, Y., Noda, S., Nakao, K., Maeda, T., Kano, M., and Aiba, A. (2014). Selective activation of mTORC1 signaling recapitulates microcephaly, tuberous sclerosis, and neurodegenerative diseases. *Cell Rep* 7, 1626-1639.

Kaufmann, W.E., and Moser, H.W. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex* 10, 981-991.

Koike-Kumagai, M., Yasunaga, K., Morikawa, R., Kanamori, T., and Emoto, K. (2009).

The target of rapamycin complex 2 controls dendritic tiling of *Drosophila* sensory neurons through the Tricornered kinase signalling pathway. *EMBO J* 28, 3879-3892.

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., *et al.* (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880-884.

Komatsu, M., Wang, Q.J., Holstein, G.R., Friedrich, V.L., Iwata, J., Kominami, E., Chait, B.T., Tanaka, K., and Yue, Z. (2007). Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14489-14494.

Kozma, S.C., Ferrari, S., Bassand, P., Siegmann, M., Totty, N., and Thomas, G. (1990). Cloning of the mitogen-activated S6 kinase from rat liver reveals an enzyme of the second messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7365-7369.

Kumar, V., Zhang, M.X., Swank, M.W., Kunz, J., and Wu, G.Y. (2005). Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* 25, 11288-11299.

Land, S.C., and Tee, A.R. (2007). Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem* 282, 20534-20543.

Laplane, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.

Lee, P.J., Jiang, B.H., Chin, B.Y., Iyer, N.V., Alam, J., Semenza, G.L., and Choi, A.M. (1997). Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* 272, 5375-5381.

Lefebvre JL, Kostadinov D, Chen WV, Maniatis T, Sanes JR. (2012). Protocadherins mediate dendritic self-avoidance in the mammalian nervous system. *Nature* 488, 517-521.

Liu, P., Gan, W., Inuzuka, H., Lazorchak, A.S., Gao, D., Arojo, O., Liu, D., Wan, L., Zhai, B., Yu, Y., *et al.* (2013). Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 15, 1340-1350.

MIALE, I.L., and SIDMAN, R.L. (1961). An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol* 4, 277-296.

Miron, M., Verdú, J., Lachance, P.E., Birnbaum, M.J., Lasko, P.F., and Sonenberg, N. (2001). The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 3, 596-601.

Montagne, J., Stewart, M.J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S.C., and Thomas, G. (1999). *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* 285, 2126-2129.

Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K., and Yamanaka, S. (2004). mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 24, 6710-6718.

Nakao, H., Nakao, K., Kano, M., and Aiba, A. (2007). Metabotropic glutamate receptor subtype-1 is essential for motor coordination in the adult cerebellum. *Neurosci Res* 57, 538-543.

Nie, D., Di Nardo, A., Han, J.M., Baharanyi, H., Kramvis, I., Huynh, T., Dabora, S., Codeluppi, S., Pandolfi, P.P., Pasquale, E.B., *et al.* (2010). Tsc2-Rheb signaling regulates EphA-mediated axon guidance. *Nat Neurosci* 13, 163-172.

Nogueira, V., Park, Y., Chen, C.C., Xu, P.Z., Chen, M.L., Tonic, I., Unterman, T., and Hay, N. (2008). Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* 14, 458-470.

Ohanna, M., Sobering, A.K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Kelly, P.A., Sotiropoulos, A., and Pende, M. (2005). Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol* 7, 286-294.

Ohne, Y., Takahara, T., Hatakeyama, R., Matsuzaki, T., Noda, M., Mizushima, N., and Maeda, T. (2008). Isolation of hyperactive mutants of mammalian target of rapamycin. *J Biol Chem* 283, 31861-31870.

Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.C., Donzé, O., Lin, T.A., Lawrence, J.C., and Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371, 762-767.

Pende, M., Um, S.H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V.L., Mestan, J., Mueller, M., Fumagalli, S., Kozma, S.C., and Thomas, G. (2004). S6K1(-)/S6K2(-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA

translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway.

Mol Cell Biol 24, 3112-3124.

Pilarski, R., Burt, R., Kohlman, W., Pho, L., Shannon, K.M., and Swisher, E. (2013).

Cowden syndrome and the PTEN hamartoma tumor syndrome: systematic review and revised diagnostic criteria. J Natl Cancer Inst 105, 1607-1616.

Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A.C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G.L.,

Polakiewicz, R.D., Sonenberg, N., and Hershey, J.W. (2004). Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. EMBO J 23, 1761-1769.

Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F.,

Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C.J., *et al.* (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. Nat Genet 36, 585-595.

Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., and Meyuhas, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev* 19, 2199-2211.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.

Seibt, J., Dumoulin, M.C., Aton, S.J., Coleman, T., Watson, A., Naidoo, N., and Frank, M.G. (2012). Protein synthesis during sleep consolidates cortical plasticity in vivo. *Curr Biol* 22, 676-682.

Shackelford DB and Shaw RJ. (2009) The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 9, 563-75.

Shahbazian, D., Parsyan, A., Petroulakis, E., Topisirovic, I., Martineau, Y., Gibbs, B.F., Svitkin, Y., and Sonenberg, N. (2010). Control of cell survival and proliferation by mammalian eukaryotic initiation factor 4B. *Mol Cell Biol* 30, 1478-1485.

Shahbazian, D., Roux, P.P., Mieulet, V., Cohen, M.S., Raught, B., Taunton, J., Hershey, J.W., Blenis, J., Pende, M., and Sonenberg, N. (2006). The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J* 25, 2781-2791.

Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.

Spilman, P., Podlitskaya, N., Hart, M.J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., Richardson, A., Strong, R., and Galvan, V. (2010). Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 5, e9979.

Sun, J., Liu, Y., Moreno, S., Baudry, M., and Bi, X. (2015). Imbalanced mechanistic target of rapamycin C1 and C2 activity in the cerebellum of Angelman syndrome mice impairs motor function. *J Neurosci* 35, 4706-4718.

Swiech, L., Perycz, M., Malik, A., and Jaworski, J. (2008). Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1784, 116-132.

Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S.H., Cotrina, M.L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M.S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., *et al.* (2014). Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron* 83, 1131-1143.

Thien, A., Prentzell, M.T., Holzwarth, B., Kläsener, K., Kuper, I., Boehlke, C., Sonntag, A.G., Ruf, S., Maerz, L., Nitschke, R., *et al.* (2015). TSC1 activates TGF- $\beta$ -Smad2/3 signaling in growth arrest and epithelial-to-mesenchymal transition. *Dev Cell* 32, 617-630.

Tsai, P.T., Hull, C., Chu, Y., Greene-Colozzi, E., Sadowski, A.R., Leech, J.M., Steinberg, J., Crawley, J.N., Regehr, W.G., and Sahin, M. (2012). Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature* 488, 647-651.

Tzatsos, A., and Kandrор, K.V. (2006). Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 26, 63-76.

Urbanska, M., Gozdz, A., Swiech, L.J., and Jaworski, J. (2012). Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) control the dendritic arbor morphology of hippocampal neurons. *J Biol Chem* 287, 30240-30256.

Walsh, C.A., Morrow, E.M., and Rubenstein, J.L. (2008). Autism and brain development. *Cell* 135, 396-400.

Weston, M.C., Chen, H., and Swann, J.W. (2014). Loss of mTOR repressors Tsc1 or Pten has divergent effects on excitatory and inhibitory synaptic transmission in single hippocampal neuron cultures. *Front Mol Neurosci* 7, 1.

Williams RS, Hauser SL, Purpura DP, DeLong GR, Swisher CN. (1980). Autism and mental retardation: neuropathologic studies performed in four retarded persons with

autistic behavior. *Arch Neurol.* 37, 749-53.

Yang, H.S., Jansen, A.P., Komar, A.A., Zheng, X., Merrick, W.C., Costes, S., Lockett, S.J., Sonenberg, N., and Colburn, N.H. (2003). The transformation suppressor Pcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol Cell Biol* 23, 26-37.

Yang, S.B., Tien, A.C., Boddupalli, G., Xu, A.W., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2012). Rapamycin ameliorates age-dependent obesity associated with increased mTOR signaling in hypothalamic POMC neurons. *Neuron* 75, 425-436.

Zhang, J., Gao, Z., Yin, J., Quon, M.J., and Ye, J. (2008). S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. *J Biol Chem* 283, 35375-35382.

Zhou, H., and Huang, S. (2011). Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Curr Protein Pept Sci* 12, 30-42.

Zhou, J., and Parada, L.F. (2012). PTEN signaling in autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurobiol* 22, 873-879.

## 第8章 図表

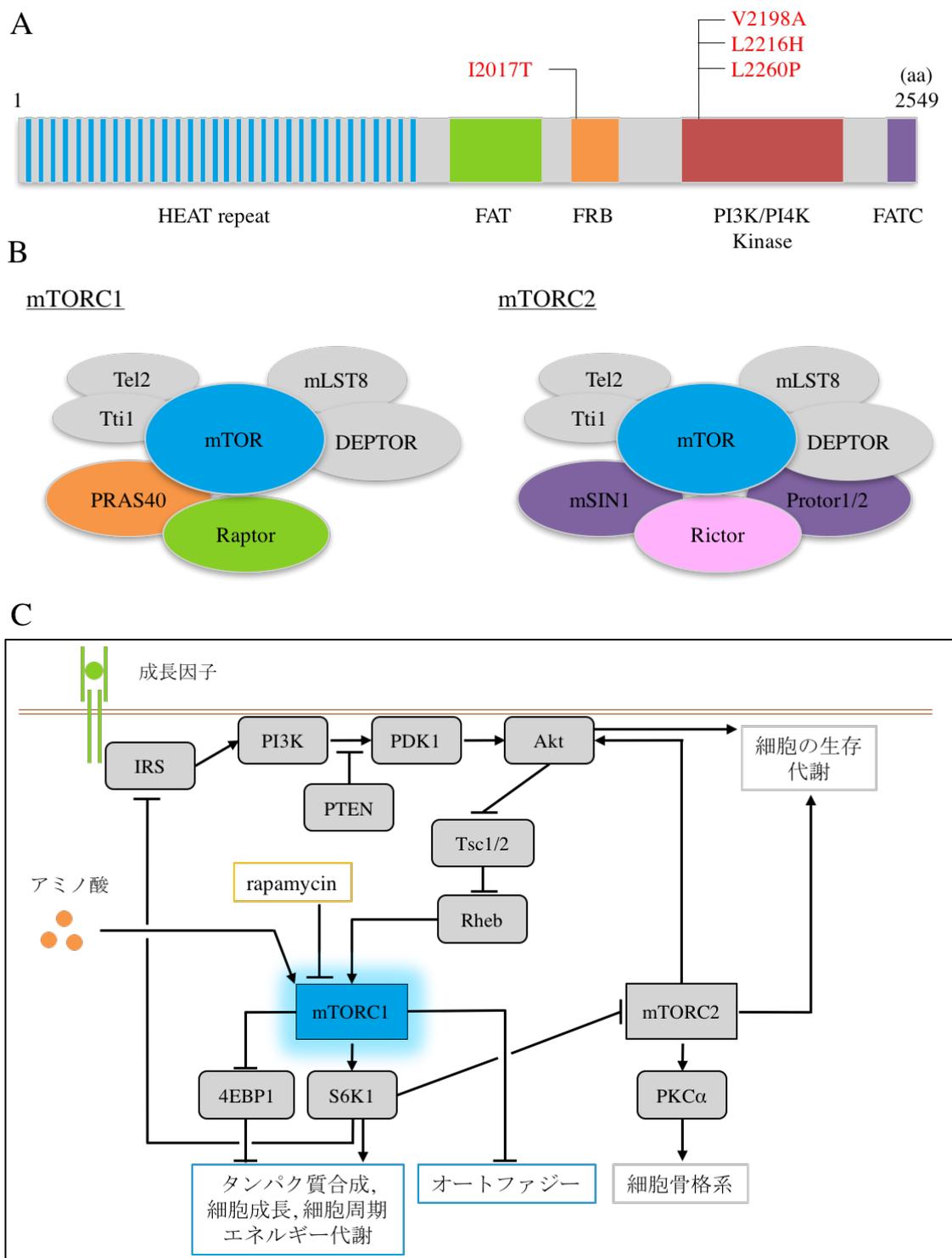
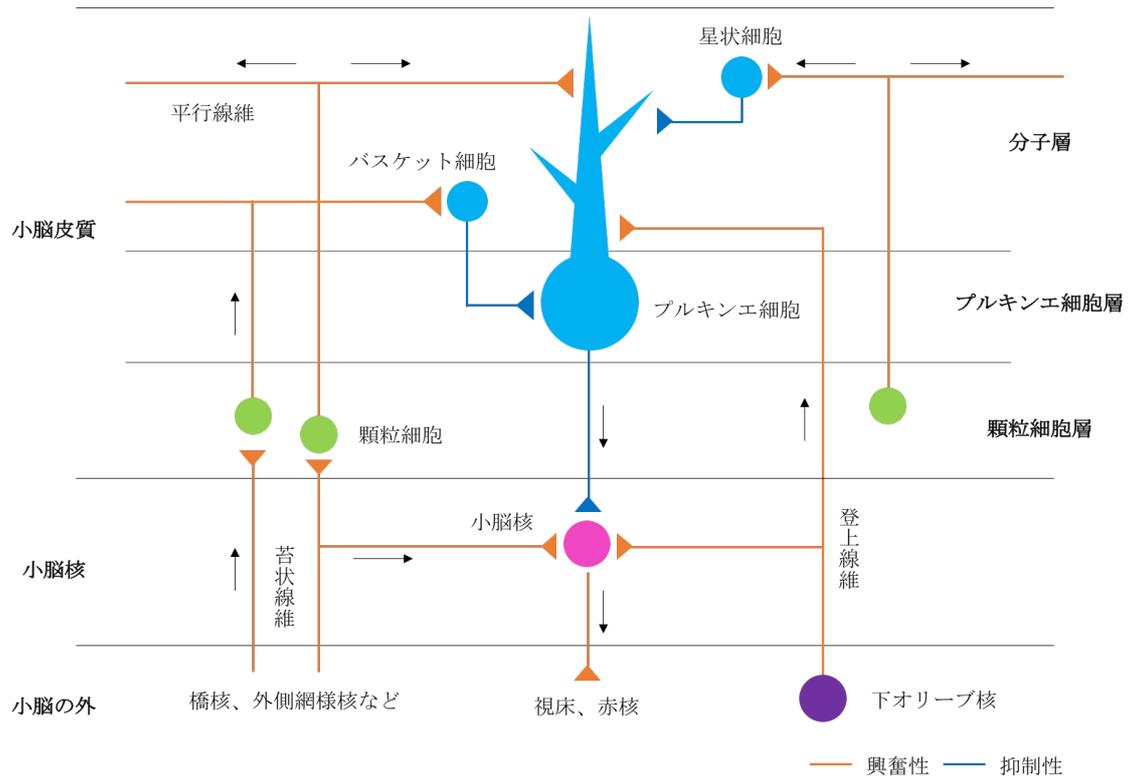


図 1. mTOR のドメイン構造と mTORC1 および mTORC2 のシグナル経路

**A.** 本研究で用いた活性型 mTOR のドメイン構造の模式図。mTOR には 5 つのドメインがあり、Raptor や Rictor などと相互作用する HEAT repeat、FKBP12-ラパマイシン複合体による mTORC1 阻害の標的となる FRB、キナーゼ活性を持つ PIKK や他に FAT、FATC が存在する。本研究で使用した活性型 mTOR は、赤字で表記した 4 カ所にアミノ酸置換がある。**B.** mTORC1 および mTORC2 複合体。mTORC1、mTORC2 の構成タンパク質に共通する分子は、Til1/Tel2、mLST8、DEPTOR である。mTORC1 には Raptor、PRAS40 が含まれ、mTORC2 には mSIN1、Protor1/2、Rictor が含まれる。Lipton and Sahin., 2014 より改変。**C.** mTORC1 および mTORC2 シグナル伝達経路。成長因子やアミノ酸刺激により mTORC1 シグナルが活性化され、タンパク質合成や細胞成長などを促進し、オートファジーを抑制する。mTORC1 シグナルの活性化が起こると、S6K1 が IRS や mTORC2 シグナルを抑制し、mTORC1 シグナルに negative feed back が働く。Laplante and Sabatini., 2012 より改変。

PKC $\alpha$  : protein kinase C alpha, PTEN : phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, Rheb : Ras homolog enriched in brain.



## 図 2. 小脳回路

小脳皮質のニューロンは 3 層構造からなっており、最深部の顆粒細胞層、中間部のプルキンエ細胞層、最も外側にある分子層がある。プルキンエ細胞は、小脳皮質における唯一の出力神経細胞であり、登上線維及び平行線維からの興奮性を入力を受けるとともに、介在ニューロンから抑制性を入力を受けている。プルキンエ細胞の軸索は、深部小脳核や脳幹の前庭神経核に投射している。図は、国立精神・神経医療研究センター神経研究所病態生化学研究部 ([http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r\\_diag/Research1-2.html](http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_diag/Research1-2.html)) より改変

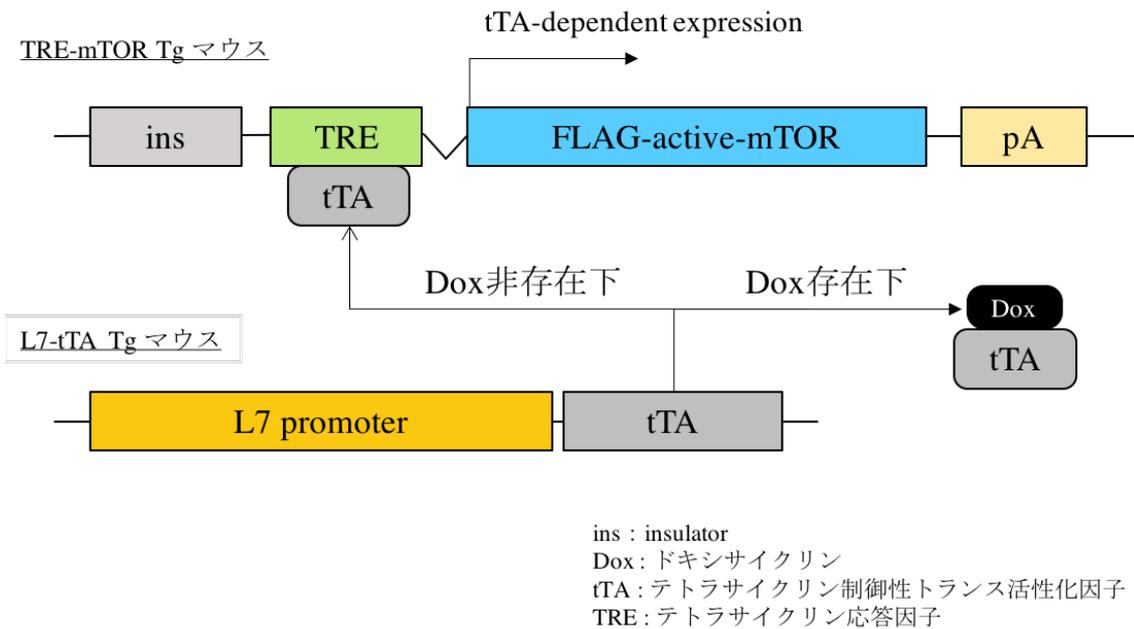


図 3. 小脳プルキンエ細胞において活性型 mTOR を発現する Tg マウスの作製  
TRE-mTOR Tg マウスは、TRE の下流に FLAG タグが付加された活性型 mTOR を持つ Tg マウスである。TRE の上流にはインシュレーターが配置されている。L7-tTA Tg マウスは、小脳プルキンエ細胞に発現する L7 プロモーターの下流に tTA を持つ Tg マウスである。これらの Tg マウスを交配させることで得られた L7-mTOR Tg マウスでは、Tet-off システムにより、活性型 mTOR の発現を時空間特異的に制御できる。Dox 存在下では、tTA が TRE との結合能を失い、活性型 mTOR の発現が抑制される。Dox 非存在下では、tTA と TRE が結合し、下流の活性型 mTOR を発現させることが可能になる。

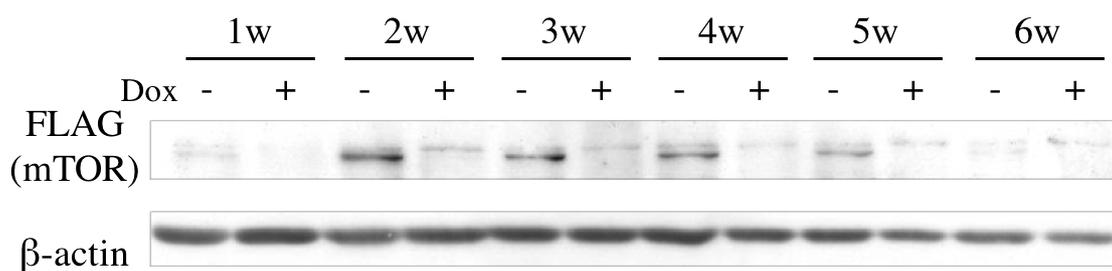
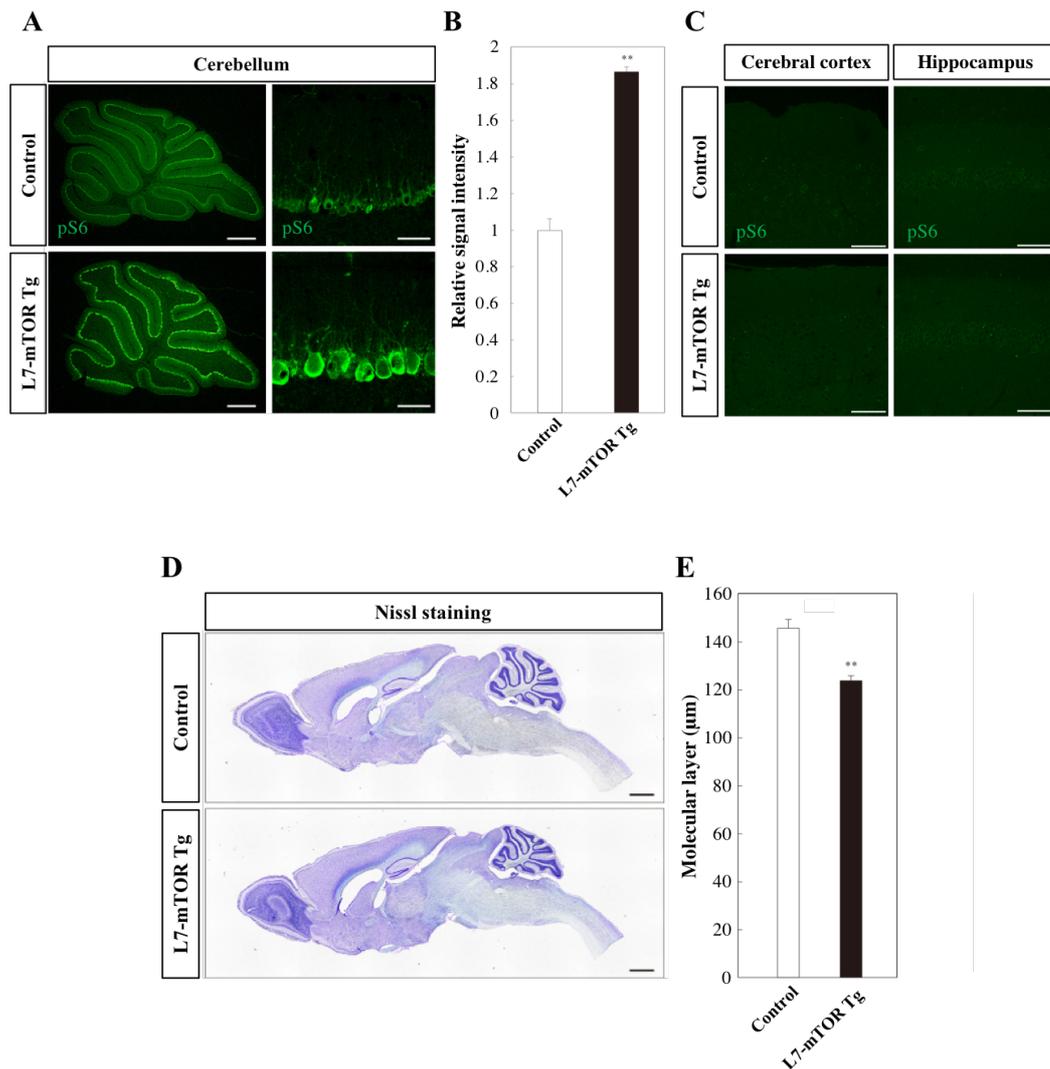


図 4. ウェスタンブロッティングによる活性型 mTOR の発現確認

1-6 週齢の Control マウス (Dox+) および L7-mTOR Tg マウス (Dox-) より小脳をサンプリングし、ウェスタンブロッティングを行い、抗 FLAG 抗体により活性型 mTOR の発現 (上) を確認した。各レーンにはタンパク質 40  $\mu\text{g}$  ずつを泳動し、ローディングコントロールとして抗  $\beta$ -actin 抗体 (下) を用いた。2 週齢から 4 週齢の L7-mTOR Tg マウスの小脳において、活性型 mTOR が多く発現していることが確認された。各マウス 3 匹ずつ用いて、3 回試行し、代表的な結果を載せた。



**図 5. mTORC1 経路の活性化と L7-mTOR Tg マウスの脳形態**

**A.** Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウス小脳の矢状断の切片に対して、抗リン酸化 S6 抗体により組織染色を行い、小脳プルキンエ細胞における mTORC1 シグナルの活性化を観察した。Control マウスと比較して、L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞において、リン酸化 S6 の強い陽性シグナルが確認された。左：スケールバーは 500 μm を表し、右：スケールバーは 50 μm を表している。各マウス 7 匹ずつ用いて、染色は 4 回試行し、代表的な結果を載せた。**B.** 小脳プルキンエ細胞の細胞体におけるリン酸化 S6 の蛍光強度を Image J により定量した。Control マウスでのリン酸化 S6 の蛍光強度を 1 に補正した。**C.** Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスの矢状断切片中の大脳皮質および海馬領域について、抗リン酸化 S6 抗体により組織染色を行い、小脳以外の領域における mTORC1 シグナルの活性化を観察した。スケールバーは 50 μm を表している。

各マウス 2 匹ずつ用いて、染色は 1 回試行した。**D. Control** マウスおよび L7-mTOR Tg マウスを 12 週齢で灌流固定し、矢状断の切片を作製し、Nissl 染色により脳全体の形態を観察した。スケールバーは 1 mm を表している。各マウス 3 匹ずつを用いて、Nissl 染色は 2 回試行し、代表的な結果を載せた。**E. Control** マウスおよび L7-mTOR Tg マウスの 4 週齢における分子層の厚さを定量した。Control マウスに比べて、有意に L7-mTOR Tg マウスの分子層の厚さが薄くなっていた。Control マウス [n = 30 (プルキンエ細胞数)、スライス 4 枚、2 匹 (マウス)]、L7-mTOR Tg マウス [n = 27 (プルキンエ細胞数)、スライス 4 枚、2 匹 (マウス)]。エラーバーは標準誤差、\*\*は t 検定における  $p < 0.01$  を示している。

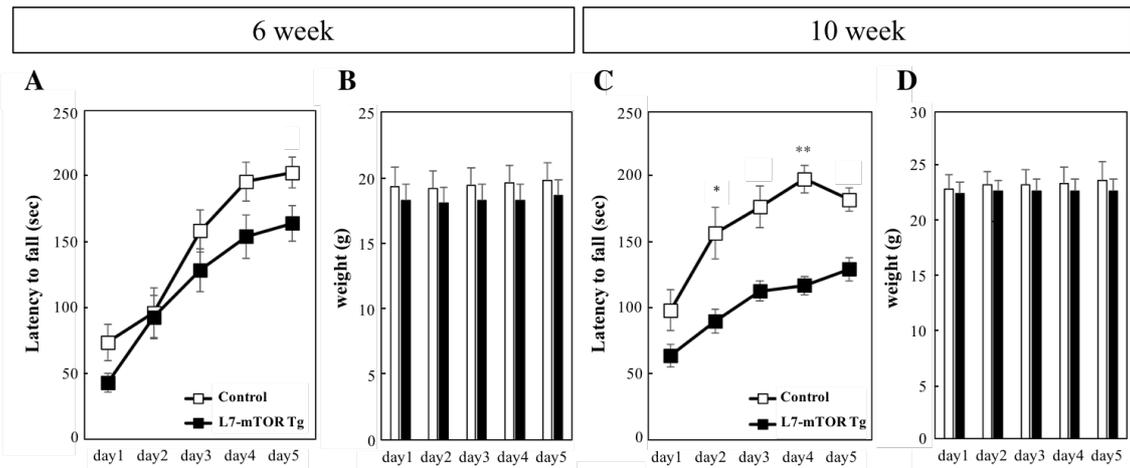
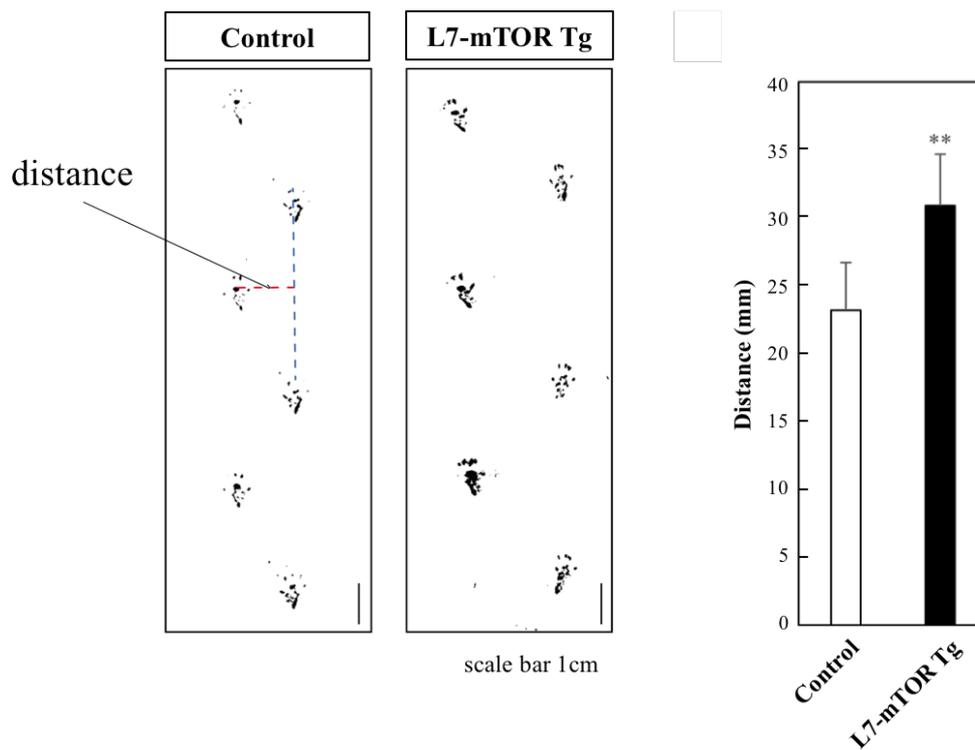


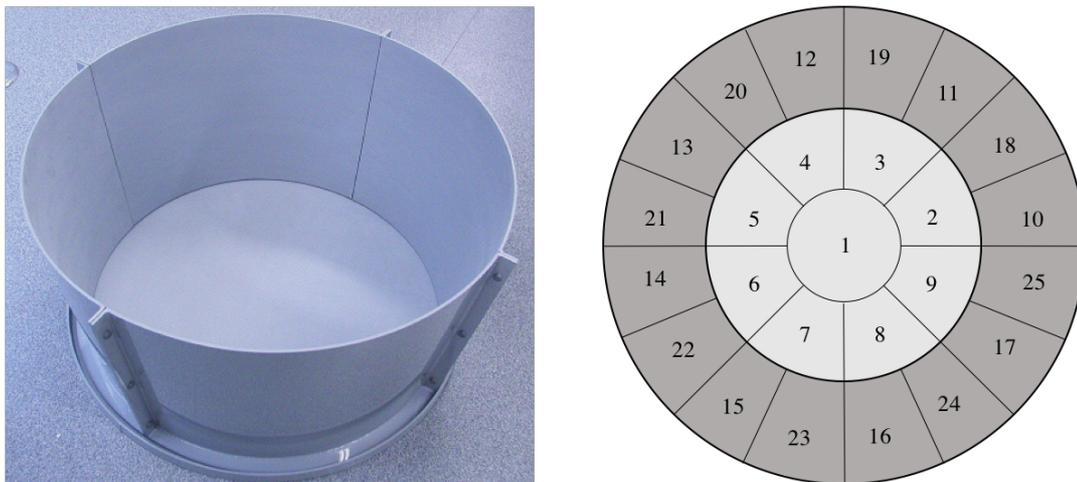
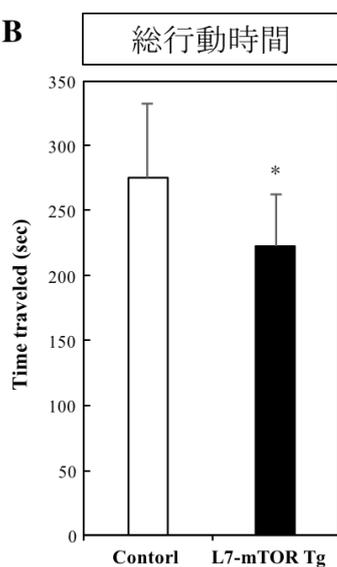
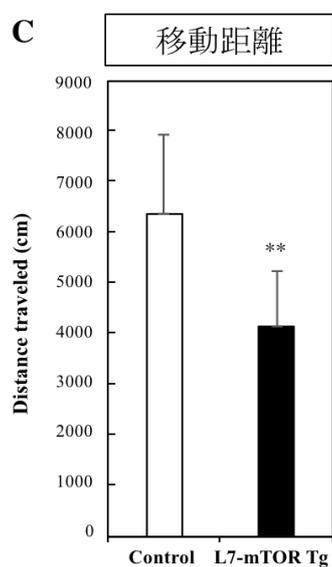
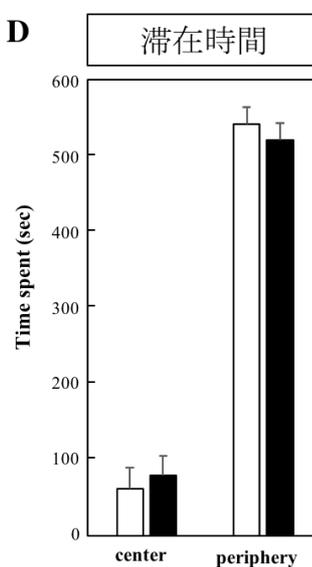
図 6. L7-mTOR Tg マウスのロータロッド解析

Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスを用いて、6 週齢および 10 週齢にロータロッド試験を行った。A, C. 各マウスがロータロッドから落下するまでの時間の平均を表している。B, D. 各マウスの各試行日の体重の平均を表している。6 週齢では、Control は 8 匹、L7-mTOR Tg は 12 匹行い、10 週齢では、Control は 8 匹、L7-mTOR Tg は 5 匹行った。エラーバーは A, C は標準誤差、B, D は標準偏差を表し、\*と\*\*は two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test におけるそれぞれ  $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$  を示している。



### 図 7. L7-mTOR Tg マウスの foot print テスト

10 週齢においてロータロッド解析を行った Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスを用いて、12 週齢時に foot print テストを行った。A. Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスの後肢の足裏にインクを付け、足跡を記録した。B. 後肢の横の開きを定量した結果である。L7-mTOR Tg マウスの方が、後肢の開きが大きく、歩行に異常があることが確認された。Control は 8 匹、L7-mTOR Tg は 5 匹行った。エラーバーは標準偏差、\*\*は t 検定における  $p < 0.01$  を示している。

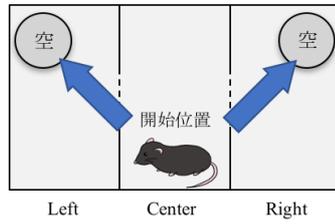
**A****B****C****D**

### 図 8. L7-mTOR Tg マウスのオープンフィールド試験

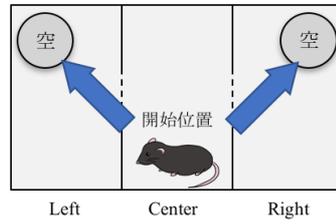
6-8 週齢の Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスを用いて、オープンフィールド試験を行った。A. オープンフィールドを 25 区画に分割した。中央 (center) を 1-9 の区画、周辺部 (periphery) を 10-25 の区画として滞在時間を測定した。記録した項目は、B. 総行動時間、C. 移動距離、D. 中心部 (center) と周縁部 (periphery) の滞在時間である。Control は 8 匹、L7-mTOR Tg は 12 匹行い、エラーバーは標準偏差、\*と\*\*は t 検定におけるそれぞれ  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  を示している。

**Habituation phase**

試験環境に慣らす。  
正常



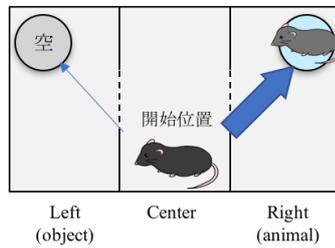
自閉症モデルマウス



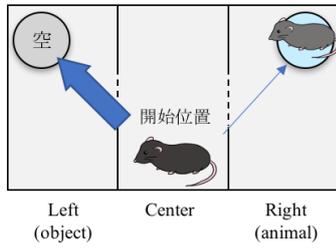
**Sociability phase**

object vs animal

正常



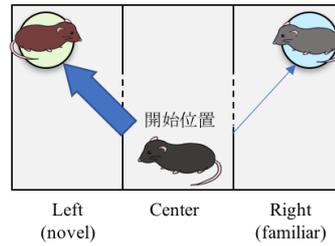
自閉症モデルマウス



**Social novelty phase**

novel vs familiar

正常



自閉症モデルマウス

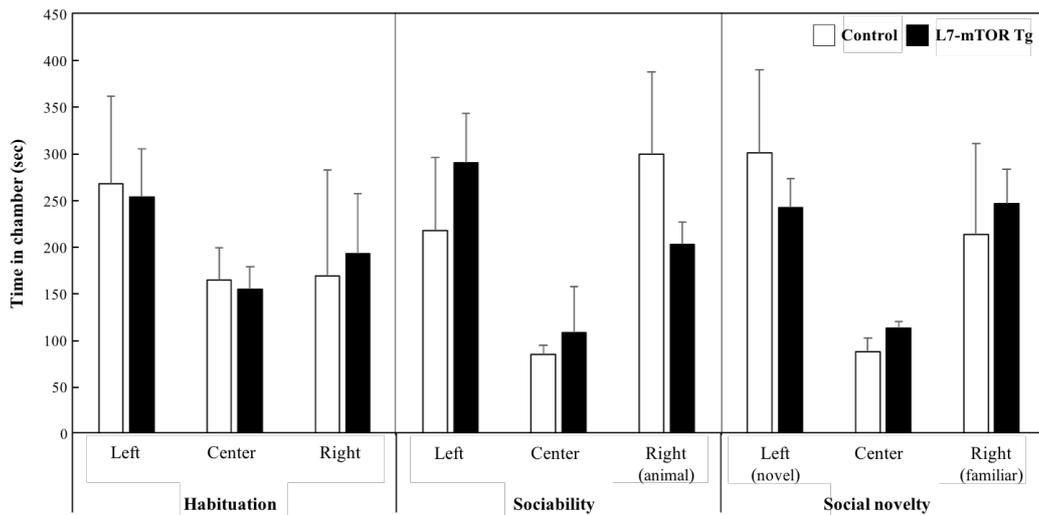
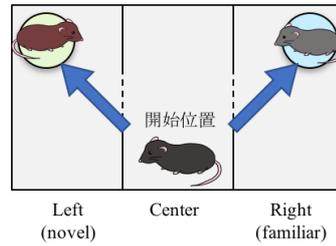


図 9. L7-mTOR Tg マウスの社会行動解析

6-8 週齢の Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスを用いて、社会行動テスト (3-chamber test) を行った。上：社会行動解析時の Habituation phase および Sociability phase、Social novelty phase の模式図。灰色の丸は、空のグリッドゲージを表し、青色・薄緑色の丸は、新奇 (novel) マウスあるいは familiar マウスが入ったグリッドゲージを表し、三角は各 phase の試験マウスの開始位置を表している。測定した項目は、Habituation phase, Sociability phase, Social novelty phase の各 chamber の滞在時間である。Control は 8 匹、L7-mTOR Tg は 12 匹行い、エラーバーは標準偏差を示している。

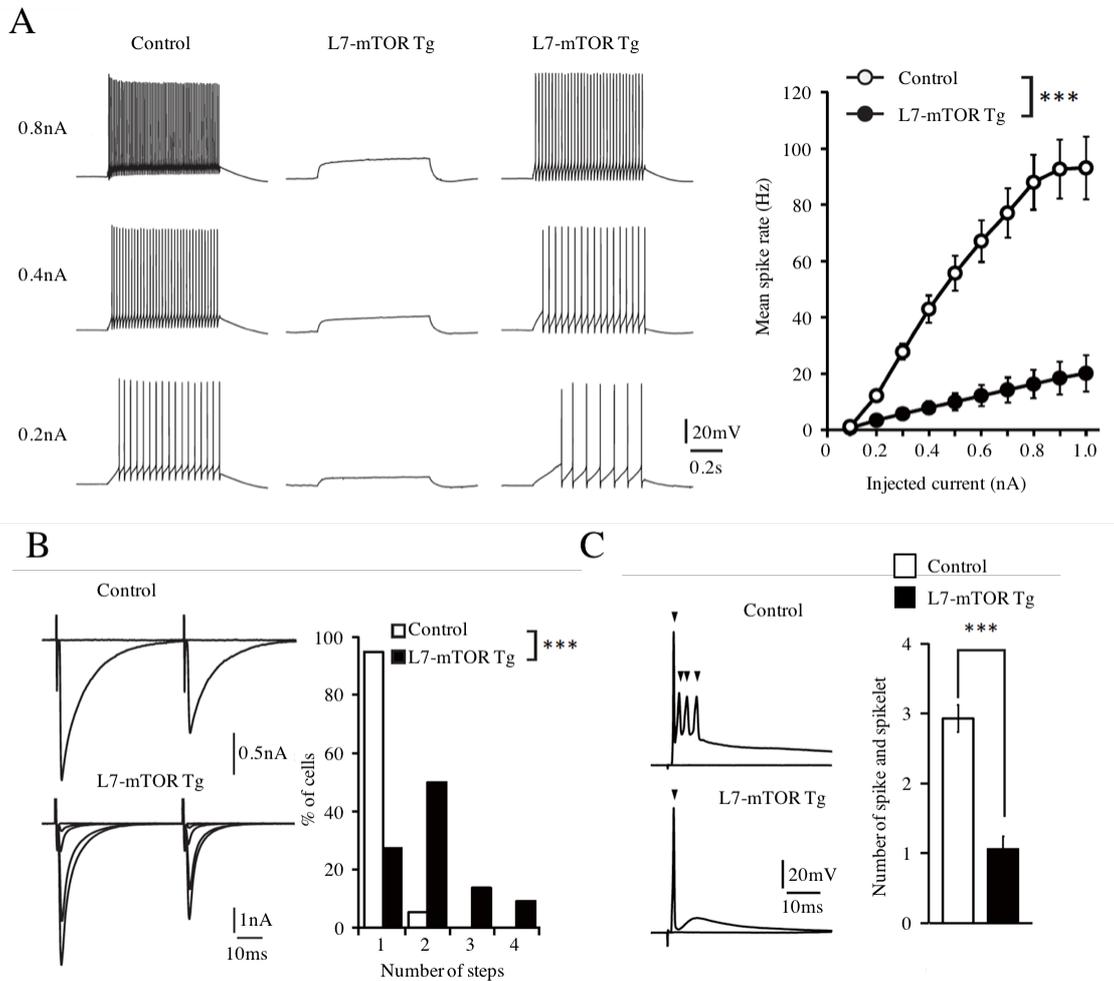


図 10. 電気生理学的解析結果

7-8 週齢の Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスを用いた。A. 左：Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞において、電流注入による電位応答を記録した。それぞれ 0.2 nA (下)、0.4 nA (中)、0.8 nA (上)の電流注入を行った。電流注入を行う際には、膜電位を-65 mV に固定した。右：注入電流 (0 nA から 1.0 nA まで) に対する平均スパイク頻度をまとめた図である。白丸は Control マウス (n=30) を表し、黒丸は L7-mTOR Tg マウス (n=24) を表している。Control マウスと比較して、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞において、発火頻度が著しく減少していた。

B. 左：Control マウス (上) および L7-mTOR Tg マウス (下) のプルキンエ細胞において、50 ms 間隔の 2 回刺激に対する CF-EPSCs の応答を記録した。保持電位は、-10 mV とした。右：記録された CF-EPSC の振幅波形数を定量した。白棒

は Control マウス [n = 38 (プルキンエ細胞数), 4 匹 (マウス)] を表し、黒棒は L7-mTOR Tg マウス [n = 22 (プルキンエ細胞数), 3 匹 (マウス)] を表している。登上線維による Control マウスと L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞の神経支配数に有意な差があることがわかった。

**C.** 左 : Control マウス (上) および L7-mTOR Tg マウス (下) のプルキンエ細胞における登上線維刺激により誘発された CF-EPSP の波形である。保持電位は、-65 mV とした。右 : スパイクおよびスパイクレット数を定量した。白棒は Control マウスのプルキンエ細胞 (n = 17) を表し、黒棒は L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞 (n = 14) を表している。L7-mTOR Tg マウスにおいて、Control マウスと比較して、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞では、スパイクおよびスパイクレット数の減少が起こっていた。

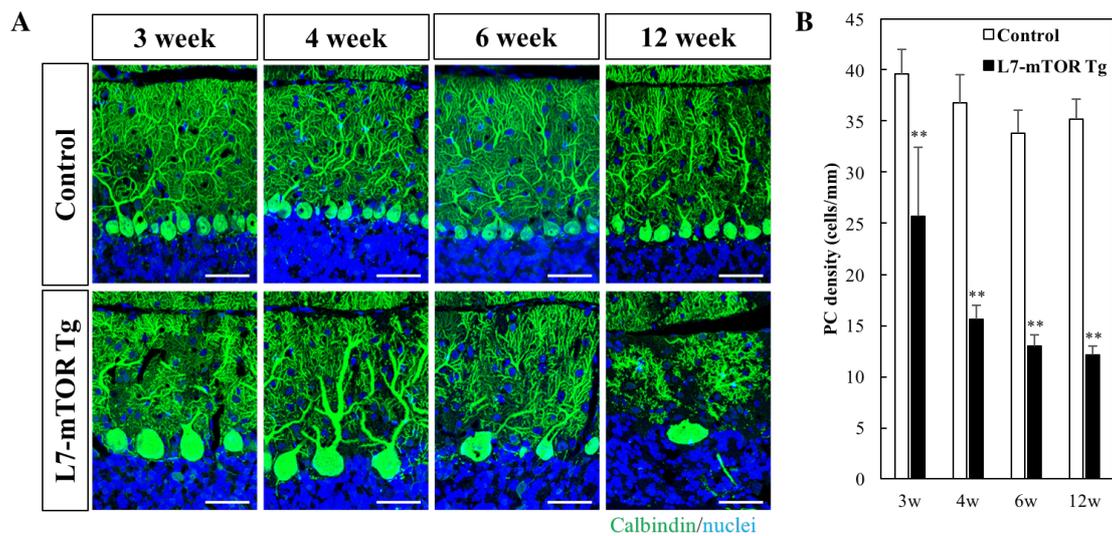


図 11. L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞の形態およびその経時変化

3, 4, 6, 12 週齢の Control マウスと L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞の形態を抗 Calbindin 抗体により蛍光免疫組織染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。A. Control マウスと比較して、L7-mTOR Tg マウスでは小脳プルキンエ細胞の肥大化が観察された。L7-mTOR Tg マウスでは、週齢が増えるに伴って、プルキンエ細胞の脱落が見られた。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を表している。B. 3, 4, 6, 12 週齢の Control マウスと L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞数を測定し、プルキンエ細胞層の長さ当たりのプルキンエ細胞数の経時変化を定量した。Control マウスと比較して、L7-mTOR Tg マウスにおいて、3 週齢以降のプルキンエ細胞数が有意に減少していた。また、エラーバーは標準偏差、\*\*は t 検定における  $p < 0.01$  を示している。各週齢 Control マウス [n = 10 (スライス数)、2 匹 (マウス)]、L7-mTOR Tg マウス [n = 10 (スライス数)、2 匹 (マウス)] ずつ計測した。

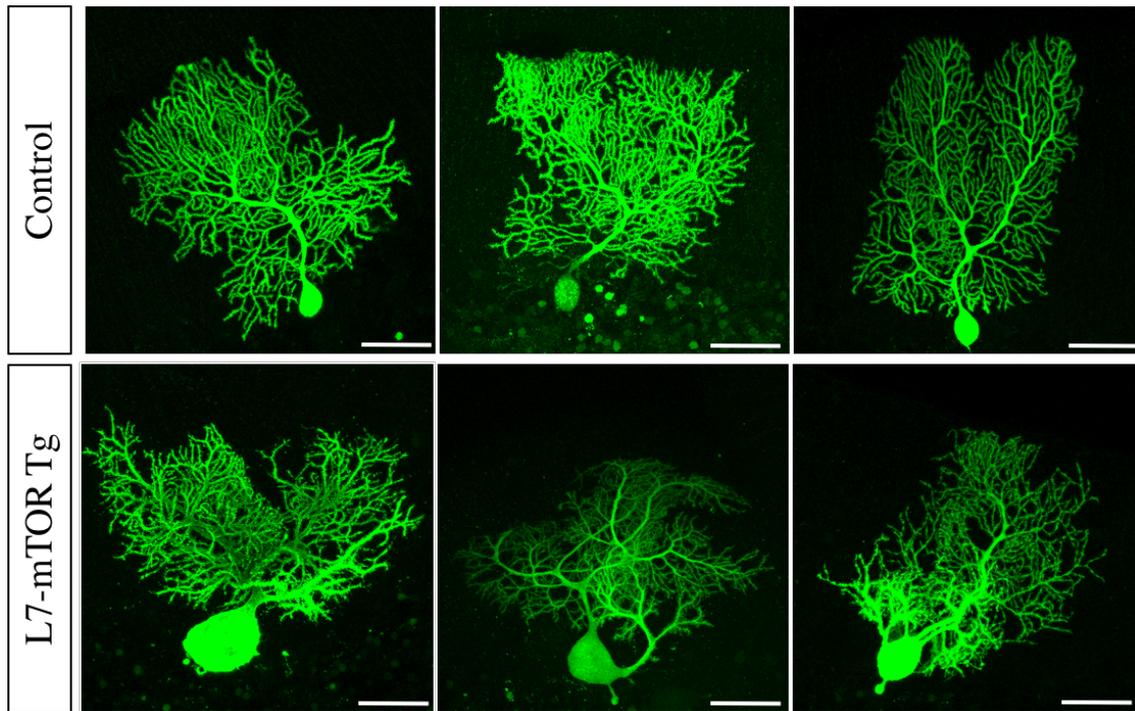


図 12. 単一の小脳プルキンエ細胞およびその樹状突起形態

電気生理学的解析を行う際にプルキンエ細胞 biocytin を注入し、Alexa-488 が結合された avidin によりプルキンエ細胞の細胞体を可視化した。L7-mTOR Tg マウスでは、プルキンエ細胞の著しい肥大化および樹状突起の異常 (self-crossing) が見られた。スケールバーは、50  $\mu\text{m}$  を示している。Control マウス [スライス 12 枚、6 匹 (マウス)]、L7-mTOR Tg マウス [スライス 12 枚、6 匹 (マウス)] ずつ形態を観察した。

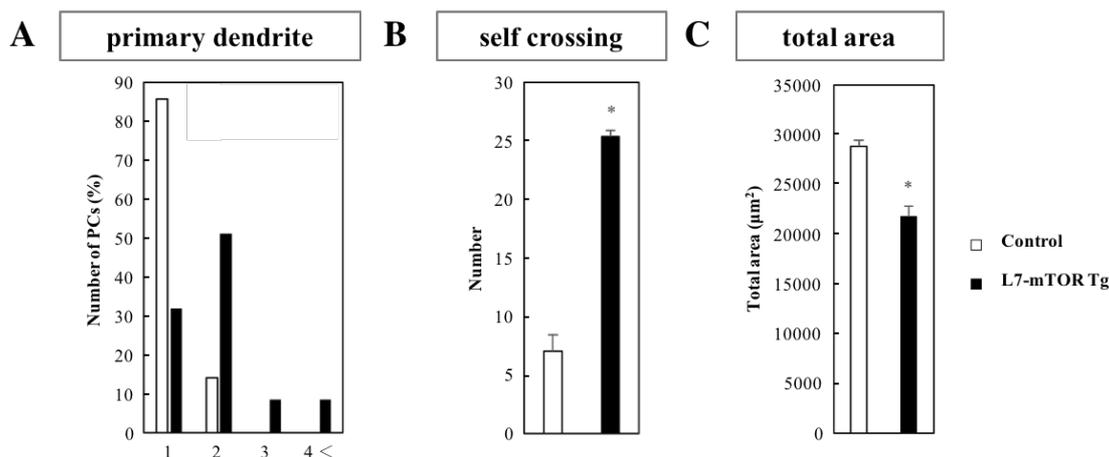
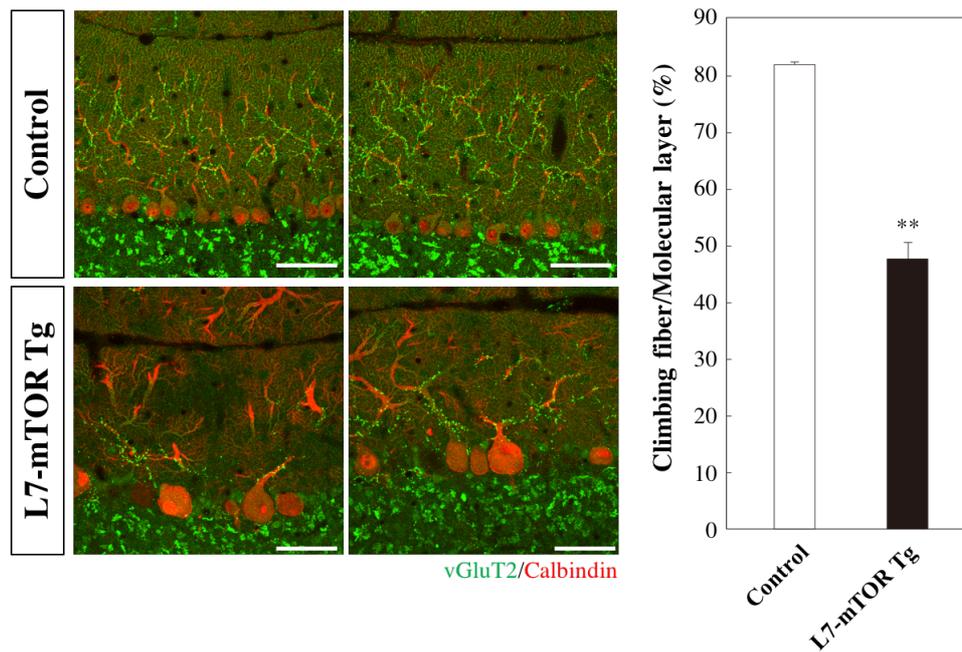


図 13. 単一のプルキンエ細胞における形態解析

図 12 で観察された Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞や樹状突起の形態を定量した。A. 単一のプルキンエ細胞の細胞体から伸びる primary dendrite 数を計測した。Control マウスに比べて、L7-mTOR Tg マウスでは、2 本以上の primary dendrite を持つプルキンエ細胞の割合が 70 %あった。Control (n = 70)、L7-mTOR Tg (n = 47)。B. 一定面積当たりの self-crossing 数を測定した。Control マウスと比較して、L7-mTOR Tg マウスでは、self-crossing 数が有意に増加していた。Control (n = 27)、L7-mTOR Tg (n = 9)。C. 単一のプルキンエ細胞から伸びる樹状突起の受容野を測定した。L7-mTOR Tg マウスでは、Control マウスよりも樹状突起の広がり狭いことがわかった。Control (n = 68)、L7-mTOR Tg (n = 41)。すべての定量に用いたマウスは、Control (n = 4)、L7-mTOR Tg (n = 6) である。エラーバーは標準偏差、\*は t 検定における  $p < 0.05$  を示している。



**図 14. L7-mTOR Tg マウスの登上線維支配**

(左)4 週齢の Control マウスと L7-mTOR Tg マウスの登上線維を抗 vGluT2 抗体により蛍光免疫組織染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。(右)分子層の厚さを分母にとり、プルキンエ細胞の細胞体から最も遠位の登上線維までの距離を分子にとり、その割合を定量した。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を表している。また、エラーバーは標準誤差、\*\*は t 検定における  $p < 0.01$  を示している。Control マウス [n = 30 (プルキンエ細胞数)、スライス 4 枚、2 匹 (マウス)]、L7-mTOR Tg マウス [n = 27 (プルキンエ細胞数)、スライス 4 枚、2 匹 (マウス)]。

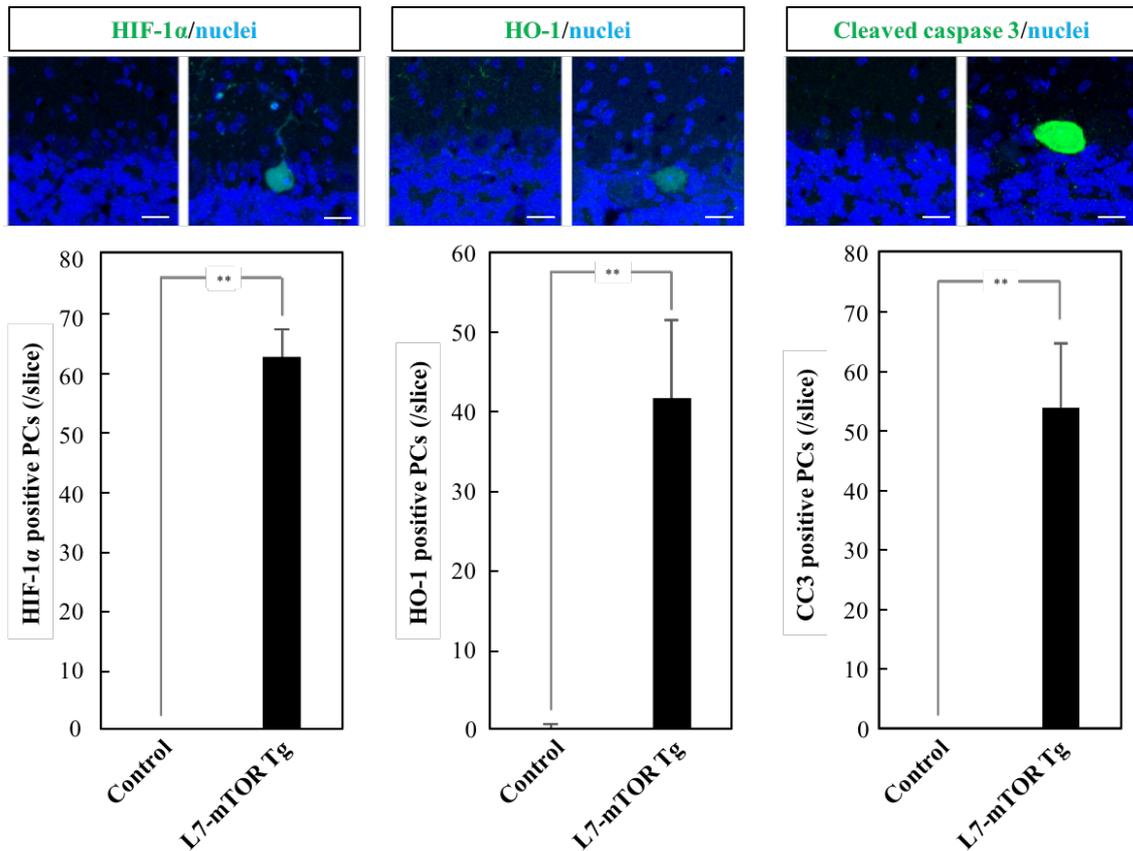


図 15. L7-mTOR Tg マウスにおける特異的なアポトーシスおよび酸化ストレスの検出

上：4週齢の Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスを灌流固定し、小脳の矢状断の切片を作製し、抗 Cleaved caspase 3 (CC3) 抗体、抗 HIF1 $\alpha$  抗体、抗 HO-1 抗体を用いて蛍光免疫組織染色を行った。Control マウスの小脳プルキンエ細胞では各抗体に対するシグナルは検知されなかったが、一方で L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞においては各抗体に対する陽性シグナルが検出された。下：それぞれ 1 切片当たりの CC3, HIF1 $\alpha$ , HO-1 陽性がプルキンエ細胞数を定量した。L7-mTOR Tg マウスにおいて、有意に各抗体が陽性であるプルキンエ細胞の増加していた。スケールバーは 20  $\mu$ m を表し、エラーバーは標準偏差を示し、\*\*は t 検定における  $p < 0.01$  を示している。また、Control および L7-mTOR Tg マウスは  $n = 3$  である。

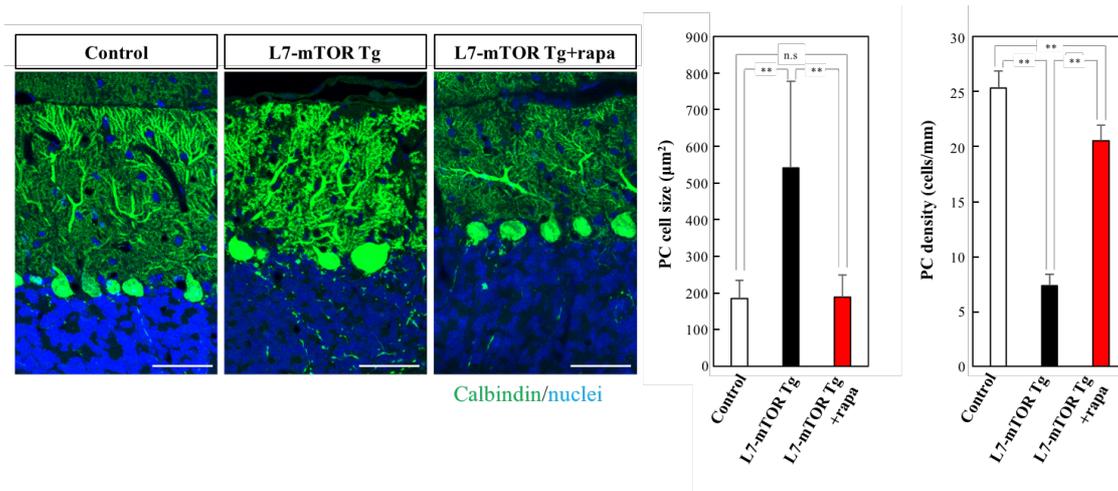
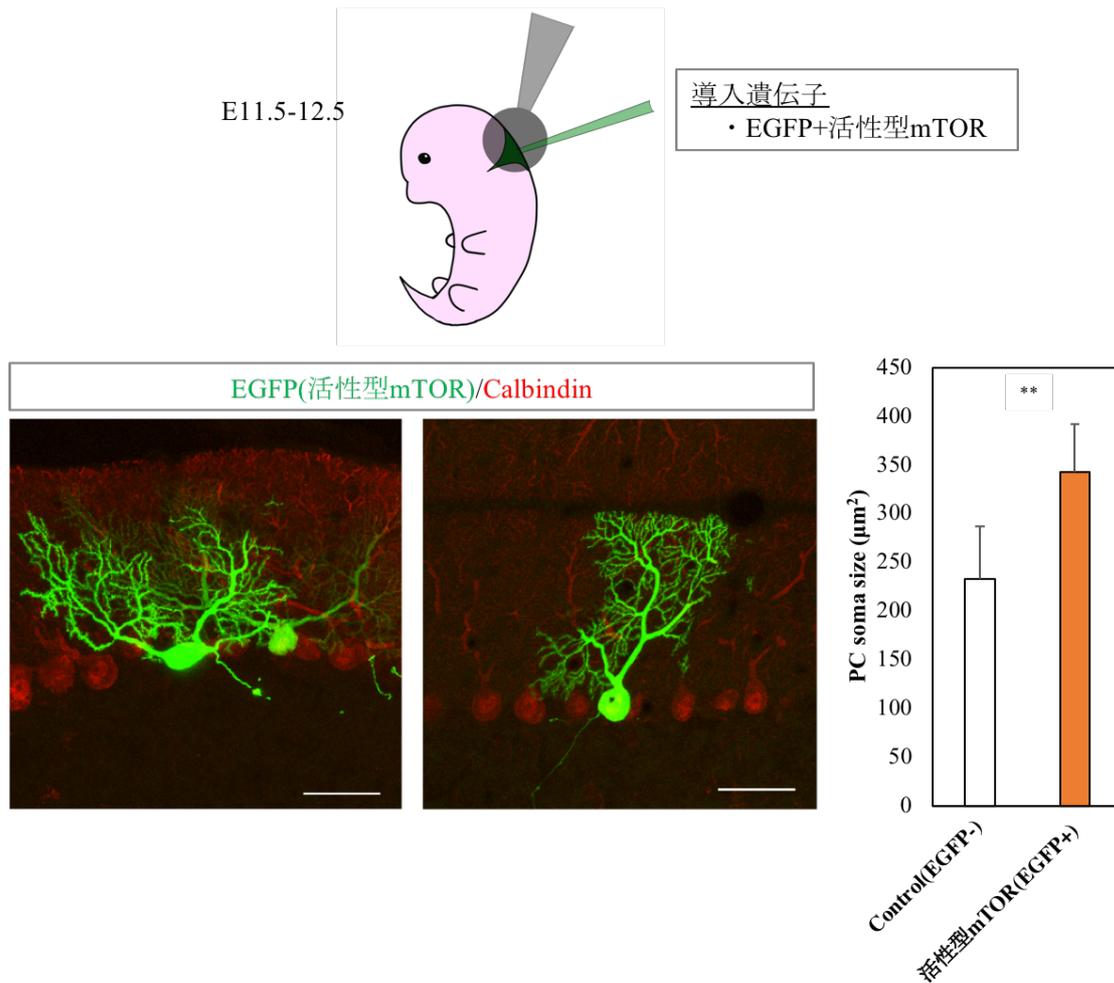


図 16. mTORC1 阻害剤 rapamycin による L7-mTOR Tg マウス表現型のレスキュー

3-6 週齢の間、L7-mTOR Tg マウスに rapamycin 投与を行い、6 週齢時に灌流固定し、同週齢の Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞形態の比較を行った。左：抗 Calbindin 抗体 (緑) および核染色 (青) による、蛍光免疫組織染色を行った。右：プルキンエ細胞の細胞体の面積とプルキンエ細胞数を定量した。L7-mTOR Tg マウスに rapamycin を投与することで、肥大化やプルキンエ細胞の減少が抑えられた。プルキンエ細胞における表現型は、mTOR シグナルの活性化が寄与していることが示唆された。スケールバーは 50 µm を表し、エラーバーは標準偏差を示し、\*\*は one-way ANOVA with Turkey's multiple comparisons test における  $p < 0.01$  を、n.s は有意な差がないことを示している。また、Control マウス [n = 188 (プルキンエ細胞数)、スライス 15 枚、3 匹 (マウス)]、L7-mTOR Tg マウス [n = 71 (プルキンエ細胞数)、スライス 9 枚、2 匹 (マウス)]、L7-mTOR Tg+rapa マウス [n = 194 (プルキンエ細胞数)、スライス 10 枚、2 匹 (マウス)]である。



### 図 17. 子宮内エレクトロポレーション法を用いた小脳プルキンエ細胞への活性型 mTOR 発現実験

E12.5 において、仔マウスの第 4 脳室に GFP のみと GFP および活性型 mTOR を発現するプラスミドを子宮内エレクトロポレーション法により導入した。左：P14 で灌流固定し、EGFP (緑) と抗 Calbindin 抗体 (赤) により、蛍光免疫組織染色を行った。右：EGFP のみを発現させた個体 (EGFP) と GFP と活性型 mTOR を発現させた個体 [活性型 mTOR (EGFP+/-)] のプルキンエ細胞の大きさを比較したところ、活性型 mTOR (EGFP+) の個体におけるプルキンエ細胞の細胞体の方が大きくなっていた。スケールバーは 50 µm を表し、エラーバーは標準偏差を、\*\*は t 検定における  $p < 0.01$  を、n.s は有意な差がないことを示している。EGFP マウス [n=37 (プルキンエ細胞数)、4 匹 (マウス)]、活性型 mTOR (EGFP+) マウス [n=76 (プルキンエ細胞数)、4 匹 (マウス)]、活性型 mTOR (EGFP-) マウス [n=52 (プルキンエ細胞数)、3 匹 (マウス)] である。

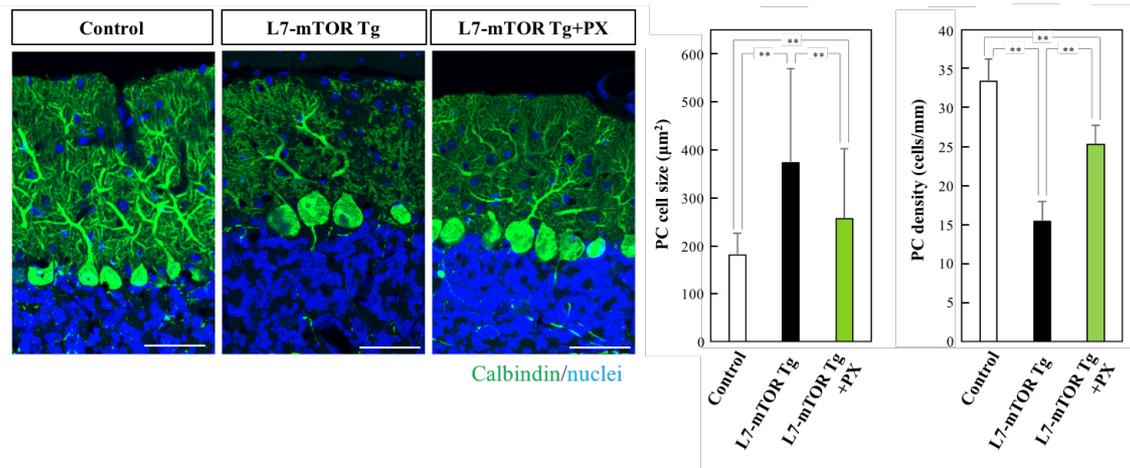


図 18. HIF1 $\alpha$  阻害剤 PX-478 による L7-mTOR Tg マウス表現型のレスキュー

3-6 週齢の間、L7-mTOR Tg マウスに PX-478 投与を行い、6 週齢時に灌流固定し、同週齢の Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞形態の比較を行った。左：抗 Calbindin 抗体 (緑) および核染色 (青) による、蛍光免疫組織染色を行った。右：プルキンエ細胞の細胞体のサイズとプルキンエ細胞数を定量した。PX-478 投与により、L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞の肥大化や減少が一部抑制された。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を表し、エラーバーは標準偏差を示し、\*\*は one-way ANOVA with Turkey's multiple comparisons test における  $p < 0.01$  を、n.s は有意な差がないことを示している。また、Control マウス [n = 543 (プルキンエ細胞数)、スライス 8 枚、2 匹 (マウス)]、L7-mTOR Tg マウス [n = 342 (プルキンエ細胞数)、スライス 8 枚、2 匹 (マウス)]、L7-mTOR Tg+PX-478 マウス [n = 276 (プルキンエ細胞数)、スライス 13 枚、3 匹 (マウス)]である。

表 1. L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞の膜特性

	Control	n	L7-mTOR Tg	n	p value
$V_{rest}$ (mV)	$-52.8 \pm 0.9$	30	$-54.4 \pm 1.6$	19	0.359
Input resistance (M $\Omega$ )	$46.0 \pm 1.4$	29	$30.3 \pm 1.9$	24	< 0.001
Spontaneous spike rate (Hz)	$22.7 \pm 4.1$	30	$2.4 \pm 1.7$	22	< 0.001

表 2. CF-EPSCs および PF-EPSCs のキネティック

		Control	n	L7-mTOR Tg	n	p value
CFs	Amplitude (pA)	1605 ± 70	32	2745 ± 185	21	< 0.001
	Rise time (ms)	0.51 ± 0.02	32	0.62 ± 0.03	19	< 0.001
	T <sub>decay</sub> (ms)	8.89 ± 0.22	32	4.85 ± 0.31	19	< 0.001
	Paired-pulse ratio	0.71 ± 0.01	32	0.67 ± 0.02	21	0.051
	Disparity ratio	0.11 ± 0.05	2	0.48 ± 0.07	15	
	Disparity index	1.13 ± 0.11	2	0.57 ± 0.10	15	
PFs	Paired-pulse ratio	1.74 ± 0.03	39	1.65 ± 0.06	14	0.115

CF : climbing fibers, PFs : parallel fibers