

条件的遺伝子操作研究チーム

Laboratory for Gene Manipulation in Mouse and Applications to the Study of Memory

チームリーダー 利根川 進
TONEGAWA, Susumu

本研究の目的は、昨年と同じである。我々は、特定の遺伝子や遺伝子類を条件付きで操作する新しい系統のマウスを作出して、それを分析することによって、学習や記憶の基礎を成している分子、細胞、神経ネットワークおよび神経系のメカニズムを引き続き研究している。

1. 組織特異的または細胞種特異的な遺伝子操作

(1) 海馬の CA3 錐体細胞の特異的遺伝子操作

昨年我々は、パターン補完による記憶想起における海馬 CA3 NMDA レセプター (NR) の役割に関する研究を発表した。本研究は NR1 遺伝子の欠失が海馬の CA3 錐体細胞に限定されているマウス系統を作出して、これらのマウスを、行動的研究や、*in vivo* (生体内) および *in vitro* (生体外) での電気生理学的研究、分子生物学的研究、細胞生物学的研究を含めた多数の分析に供することによって、実施した。同じ変異体マウスについてのその後の我々の研究では、これらの変異体は、空間的参照記憶は正常であるが、1 回限りの試行後の空間的記憶 (例えばエピソード様の記憶) の迅速な獲得の点で障害のあることが明らかになった。多電極記録法を用いて行った実験では、行動的研究からこれらの結果が確認された。つまり、変異 CA1 場所細胞の空間的整調は、馴染みのある環境中では正常であるが、新しい環境においては著しく障害された (例えばレース野の拡大や統合的発射速度の促進がみられた)。

(2) 海馬の歯状回 (DG) 顆粒状細胞特異的遺伝子操作

ハーバード大学医学部の Dr. Nina Balthasar および Prof. Bradford Lowell と共同して、我々は、遺伝子欠失が成熟マウスの海馬の DG 顆粒状細胞に限定されている新しい NR1 ノックアウトマウス (DG-NR1 KO マウス) を作出した。これは、Cre 発現がプロオピオメラノコルチン (POMC) 由来の転写プロモータによって誘導される Cre-loxP システムを用いて達成した。我々は、Cre マウスを Rosa 26 レポーターマウスと交配したときに、DG だけでなく視床下部でも Cre-loxP 組換え体を観察した。しかし、floxed NR1 は、Rosa 26 における floxed STOP に比べて Cre 組換え体により強く抵抗するために、その組換え体の空間的制限は、DG-NR1 KO マウスの方が、Rosa 26 マウスの場合よりも大きく、それも DG 顆粒状細胞に限定されていた。我々は、*in vivo* での記録を採ることによって、長期増強 (LTP) が、変異体マウスでの貫通回路 (PP) - 歯状回シナプスにおいて特異的に欠損していることを確認した。CA1-NR1 KO マウスとは対照的に、DG-NR1 KO マウスはモリス水迷路の隠れプラットフォーム回転の点で正常であったが、これは、空間的参照記憶の形成にとっては

PP-DG シナプスにおける NMDA レセプター依存的可塑性が必ずしも必要ではないことを意味している。

(3) 皮質および海馬に特異的な遺伝子操作

(i) MAP キナーゼシグナル化。我々は、ドミナントネガティブ形の MEK1 が生後前脳における ERK 活性化を阻害するトランスジェニックマウスを作出した。これらのマウスは、海馬の記憶保存と、海馬の L-LTP の翻訳依存的、転写非依存的段階において選択的な欠損を呈した。海馬ニューロンにおいては、ERK 阻害は、ニューロン活動で誘導される翻訳と、転写因子 (eIF4E, 4EBP1 および rpS6) のリン酸化とを妨害した。これに対応して、L-LTP を誘発する反復刺激によって対照区の海馬スライスにおいて誘発されるタンパク質合成と翻訳因子リン酸化とが、変異体のスライスにおいては著しく抑制された。記憶形成によって対照区の海馬において誘発される翻訳因子リン酸化も同様に、変異体の海馬では低下した。これらの結果から、長期持続型のシナプスの可塑性および記憶においては、MAPK シグナル化による翻訳調節の重大な役割が明らかになる。

(ii) p21 によって活性化されるキナーゼ (PAK) のシグナル化。我々は、低分子量 GTP アーゼ Rac/Cdc 42 の主要な下流エフェクターである PAK のドミナントネガティブ形の発現が生後前脳の興奮性ニューロンに限定されているトランスジェニックマウスを作出した。PAK は、アクチンダイナミクスの調節にその役割を果たすことによって、樹状突起棘形成に影響を与えることが知られていて、我々は、大脳皮質の棘およびシナプスの構造と密度が長期記憶に密接に関連しているかどうかを明らかにするために、このトランスジェニックマウスを用いた。トランスジェニックマウスの皮質ニューロンにおいては、棘が少なく、短くて大きい棘の比率が高くなっていたが、皮質ではこのような異常が認められなかった。このような形態的变化は、とくに皮質において、シナプスの平均的強度の増大と、異常なシナプス可塑性に関連していた。重要な点は、海馬と皮質のシナプスの形態と可塑性との間のこのような解離が、記憶の獲得ではなく長期固定の行動的不完全さに相関していることであった。従って、これらの結果から、樹状突起棘の大きさの分布と密度の調節に果たす PAK の重要な役割が明らかになった。これらの結果はさらに、シナプスの大きさを決定する際に棘が主要な役割を果たすことや、長期記憶保持に際しての皮質におけるシナプスの大きさおよび密度の分布の恒常性が重要であることも示唆している。

(4) 背側視床 (DT) 特異的遺伝子操作

覚醒から睡眠への移行中に、脳の細胞は沈静化しない。その代わりに、錐体ニューロンが、覚醒中の規則的なスパ

イク発生から、睡眠中の活動電位の短くて高頻度の群発へとその活動様式を変化させる。視床においては、このような独特の形状のニューロン活動が何を目的としているかは不明であるが、睡眠に関連した群発的活動は、閾値の低いT型カルシウムチャネルアルファ1サブユニットCav 3.1によって媒介されることが知られている。この群発的活動の目的を解明するために、我々は、Cav 3.1に対する条件付きノックアウト対立遺伝子を創り、Cre-loxP法を用いて視床特異的遺伝子操作のための新しい方法を開発した。我々は、前脳の錐体ニューロン特異的遺伝子操作が可能な現存のマウスも利用した。視床または前脳の錐体ニューロンにおいてCav 3.1 mRNAを選択的に欠失したマウスは、訓練後の24時間にわたって測定した構成的恐怖記憶の不完全な消失と記憶保持の増強を示した。これらの結果は、睡眠に関連したニューロン活動が、嫌な経験によって信号化された記憶を抹消するのに役立つことがあるという見解を支持するものであり、また、脳外傷による障害を治癒させる際に睡眠が役立つ可能性を示唆している。

2. 条件付き（空間的および時間的に制限された）遺伝子操作

(1) Cre-loxP とテトラサイクリントランス作用因子 (tTA) の組合せを基礎にした方法

上述したように、我々は、数種類の組織特異的または細胞種特異的 Cre トランスジェニックマウスを持っている。組織または細胞種に制限された遺伝子操作に時間的制御を導入するために、我々は、loxP-stop-loxP tTA トランスジェニックマウス系統を作出した。我々の戦略は、これらのマウスを Cre トランスジェニックマウスと交配させ、その結果得られる二重トランスジェニックマウスを、ある遺伝子の発現が O^{tet} 最小プロモータの制御下にある3番目のトランスジェニックマウスと交配させることである。この遺伝子は、野生型のもの（この場合にはその遺伝子の過剰発現を達成できる）や、ドミナントネガティブ型のもの（この場合にはその遺伝子が内在遺伝子を阻害するであろう）、構成的活性型のもの（この場合には遺伝子発現の脱制御が達成されるであろう）を対象にできる。我々は、loxP-stop-loxP tTA トランス遺伝子の発現を駆動させるためにニワトリの α -アクチンプロモータを用いて、それらのトランスジェニックマウスをCA3特異的 Cre マウスまたはDG特異的 Cre マウスと交配させ、この二重トランスジェニックマウスを O^{tet} GFP リポーターマウスと交配させることによって、細胞種特異的なtTA発現を検定した。細胞種に制限された強力なtTA発現を観察した。我々はこの技術を破傷風毒素に応用したが、この毒素はVAMP2を切断し、そのためにシナプス前終末からの神経伝達物質の放出を阻害する。我々の計画は、シェーファー側副繊維や苔状繊維などの特定の興奮性シナプス前終末からの神経伝達物質の放出を一過性にかつ可逆的に阻害することである。

The objectives are the same as those of the last year. We continue to study the molecular, cellular, neural network, and neural systems mechanisms underlying learning and memory by creating and analyzing new strains of mice in which a specific gene or genes are conditionally manip-

ulated.

1. Tissue or cell type-specific gene manipulation

(1) Hippocampal CA3 pyramidal cell-specific gene manipulation

Last year we published our work on the role of the hippocampal CA3 NMDA receptors (NR) in memory recall by pattern completion. The work was carried out by generating a mouse strain in which the deletion of the NR1 gene was restricted to the CA3 pyramidal cells of the hippocampus and subjecting these mice to a multitude of analyses including behavioral studies, *in vivo* and *in vitro* electrophysiology and molecular and cellular biology. Our subsequent study on the same mutant mice demonstrated that while being normal in spatial reference memory, these mutants were impaired in the rapid acquisition of spatial memory following just one trial (i.e., episodic-like memory). Experiments carried out using the multielectrode recording techniques corroborated these results from behavioral studies: spatial tuning of the mutant CA1 place cells was normal in a familiar environment but was significantly impaired (e.g., enlarged place field and augmented integrated firing rate) in a novel environment.

(2) Hippocampal DG granular cell-specific gene manipulation

In collaboration with Dr. Nina Balthasar and Prof. Bradford Lowell of Harvard Medical School, we created a new NR1 knockout mouse in which the gene deletion is restricted to dentate gyrus (DG) granule cells of the hippocampus of an adult mouse (DG-NR1 KO mouse). This was accomplished using the Cre-loxP system in which the Cre expression was driven by the transcriptional promoter from proopiomelanocortin (POMC). We observed Cre-loxP recombination not only in the DG but also in the hypothalamus when the Cre mouse was crossed to the Rosa26 reporter mouse. However, because the floxed NR1 is more resistant to Cre recombination than the floxed STOP in the Rosa26, the spatial restriction of the recombination was greater in the DG-NR1 KO mouse than in the Rosa26 mouse and was restricted to the DG granule cells. We confirmed by *in vivo* recordings that LTP is specifically deficient at perforant path (PP)-dentate synapses in the mutant mice. In contrast to CA1-NR1 KO mice, DG-NR1 KO mice were normal in the hidden platform version of the Morris water maze, indicating that NMDA receptor-dependent plasticity at PP-DG synapses is dispensable for the formation of spatial reference memory.

(3) Cortex and hippocampus-specific gene manipulations

(i) MAP kinase signaling

We have generated a transgenic mouse in which a dominant negative form of MEK1 inhibits ERK activation in the postnatal forebrain. These mice exhibited selective deficits in hippocampal memory retention and the translation-dependent, transcription-independent phase of hippocampal L-LTP. In hippocampal neurons, ERK inhibition blocked neuronal activity-induced translation as well as phosphorylation of the transcription factors eIF4E, 4EBP1 and rpS6. Correspondingly, protein synthesis and translation factor phosphorylation induced in control hippocampal slices by L-LTP-generating tetanization were significantly reduced in mutant slices. Translation factor phosphorylation induced in the control hippocampus by memory formation was similarly diminished in the mutant hippocampus. These results define a crucial role for translation control by MAPK signaling in long-lasting forms of synaptic plasticity and memory.

(ii) p21-activated kinase (PAK) signaling

We have generated a transgenic mouse in which the expression of a dominant negative form of PAK, a major downstream effector of the small GTPases Rac/Cdc42, is restricted to excitatory neurons in the postnatal forebrain. PAK is known to affect spine formation through its role in the regulation of actin dynamics and we used this transgenic mouse strain to investigate whether the structure and density of cortical spines and synapses are critically involved in long-term memory. In the transgenic mice, cortical neurons had fewer spines and a higher proportion of short, large spines, but no such abnormalities were found in the cortex. These morphological alterations were associated with enhanced mean synaptic strength and abnormal synaptic plasticity, specifically in the cortex. Importantly, this dissociation between hippocampal and cortical synaptic morphology and plasticity was correlated with behavioral deficits in long-term consolidation but not in acquisition of memory. Thus, these results demonstrate a critical role of PAK in the regulation of the size distribution and density of spines. The results further suggest a primary role of spines in the determination of the synaptic sizes and the importance of homeostasis of the distribution of synaptic size and density in the cortex in the maintenance of long-term memory.

(4) Dorsal thalamus (DT)-specific gene manipulation

During the transition from wake to sleep, cells in the brain do not become silent. Instead, pyramidal neurons change their mode of activity from regular spiking while awake to short, high frequency bursts of action potentials during sleep. The purpose of this unique form of neuronal activity is unknown, however, in the thalamus, sleep-related bursting is known to be mediated by the low threshold, T-type calcium channel $\alpha 1$ subunit Cav3.1. To determine the purpose of this bursting, we created a conditional knockout allele for Cav3.1 and developed new methods for thalamus-specific gene manipulation using Cre-loxP techniques. We also made use of existing mice that allow forebrain pyramidal neuron-specific gene manipulation. Mice with selective deletion of Cav3.1 mRNA in thalamic or forebrain pyramidal neurons exhibited enhanced retention and defective extinction of contextual fear memory measured 24 hours following training. These results support the notion that sleep-related neuronal activity may serve to erase memories encoded by aversive experience and suggest a possible role for sleep in healing post-traumatic disorders.

2. Conditional (spatially and temporally restricted) gene manipulation

(1) Combined Cre-loxP and tetracycline transactivator (tTA)-based method

As stated above, we have several tissue-specific or cell type-specific Cre transgenic mice. In order to introduce temporal control to tissue- or cell type-restricted gene manipulation, we have generated loxP-stop-loxP tTA transgenic lines. Our strategy is to cross these mice to Cre transgenic mice and cross the resulting double transgenic lines to the third transgenic mouse in which the expression of a gene is under the control of the O^{tet} minimal promoter. This gene can be of the wild type form (in which case one may accomplish overexpression), a dominant negative form (in which case one would inhibit the endogenous gene) or a constitutively active form (in which case one would attain deregulation of the gene expression). We used chicken β -actin promoter to drive the expression of the loxP-stop-loxP tTA transgene, crossed them to the CA3-specific Cre

or DG-specific Cre mouse, and tested cell type-specific expression of tTA by crossing the double transgenics to the O^{tet} GFP reporter mouse. We have observed strong cell type-restricted expression of tTA. We have applied this technique to tetanus toxin which cleaves the VAMP2 and thereby inhibits the neurotransmitter release from the presynaptic terminals. Our plan is to transiently and reversibly inhibit the neurotransmitter release from a specific excitatory presynaptic terminal such as Schaffer collateral or mossy fibers and deduce the function of the specific excitatory hippocampal circuitry in learning and memory.

Research Subjects and Members of Laboratory for Gene Manipulation in Mouse and Applications to the Study of Memory

1. Tissue or cell type-specific gene manipulation
2. Conditional (spatially and temporally restricted) gene manipulation

Principal Investigator

Dr. Susumu TONEGAWA

Postdoctoral Associates

Dr. Sumantra CHATTARJI
Dr. Patrik KUNZLER
Dr. Thomas MCHUGH
Dr. Toshiaki NAKASHIBA
Dr. Kazutoshi NAKAZAWA
Dr. Kuan Hong WANG
Dr. Cecile SPIELEWOY
Dr. David GERBER

Graduate Students

Mr. Arvind GOVINDARAJAN

Technical Assistants

Mr. Walter FISCHLER
Dr. Lorene LEITER
Mr. Sean PERRY

Machinist

Mr. Sylvester SZCZEPANOWSKI

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) * 印は査読制度がある論文

- Shutoh F., Katoh A., Ohki M., Itohara S., Tonegawa S., and Nagao S.: "Role of protein kinase C family in the cerebellum-dependent adaptive learning of horizontal optokinetic response eye movements in mice", *Eur. J. Neurosci.* **18**, 134-142 (2003). *
- Nakazawa K., Sun L. D., Quirk M. C., Rondi-Reig L., Wilson M. A., and Tonegawa S.: "Hippocampal CA3

- NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience”, *Neuron* **38**, 305–315 (2003). *
- Hinds H. L., Goussakov I., Nakazawa K., Tonegawa S., and Bolshakov V. Y.: “Essential function of α -calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in neurotransmitter release at a glutamatergic central synapse”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4275–4280 (2003). *
- Fukaya M., Kato A., Lovett C., Tonegawa S., and Watanabe M.: “Retention of NMDA receptor NR2 subunits in the lumen of endoplasmic reticulum in targeted NR1 knockout mice”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4855–4860 (2003). *
- Miyakawa T., Leiter L. M., Gerber D. J., Gainetdinov R. R., Sotnikova T. D., Zeng H., Caron M. G., and Tonegawa S.: “Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8987–8992 (2003). *
- Gerber D. J., Hall D., Miyakawa T., Demars S., Gogos J. A., Karayiorgou M., and Tonegawa S.: “Evidence for association of schizophrenia with genetic variation in the 8p21.3 gene, *PPP3CC*, encoding the calcineurin gamma subunit”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8993–8998 (2003). *
- (総説)
- Tonegawa S., Nakazawa K., and Wilson M. A.: “Genetic neuroscience of mammalian learning and memory”, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **358**, 787–795 (2003).