

遠藤研究ユニット

Endo Research Unit

ユニットリーダー 遠藤 昌 吾

ENDO, Shogo

記憶と思考の器官である脳は神経細胞内の巧みに制御された分子機構により支えられている。すなわち、神経細胞の機能が全ての精神活動の源である。精神活動の基礎機構である記憶や神経可塑性、そして、それらを支える分子機構を明らかにすることは、現代神経科学の分野の最重要課題の1つである。本研究ユニットのユニットリーダーは無脊椎動物アメフラシにおける記憶の研究を皮切りにして記憶や学習に関わる細胞内分子機構の研究を経験しており、現在は脊椎動物を対象として、生化学的、分子生物学的手法、さらに、ジーンターゲットングの手法を用いて記憶の分子機構を解析している。

1. 小脳長期抑圧 (Long-term depression) における NO-cGMP-PKG-cGMP-dependent protein kinase カスケードの機能

小脳依存性の各種の学習を支える神経可塑性は長期抑圧 (LTD) であると考えられる。LTD には各種の細胞内情報伝達系が関与し、その中の1つが NO (一酸化窒素) により開始されるカスケードである。このカスケードはプルキンエ細胞において PKG を活性化するが、その基質は明らかではなかった。

(1) PKG 下流因子の単離とその特徴付け (遠藤, 鈴木)

本ユニットでは PKG の下流因子として PKG により効率的にリン酸化され、小脳プルキンエ細胞に特異的に局在するタンパク質、G-substrate の特徴付けを行ってきた。ヒト、ラット、マウスから G-substrate の cDNA を単離するとともに、G-substrate 特異的な抗体や組換え G-substrate の精製等が可能となった。また、各種の変異を導入した組換え G-substrate も得ることができた。これらの G-substrate 変異体の生化学的解析よりリン酸化された G-substrate はタンパク質脱リン酸化酵素 (タンパク質) の阻害剤として働くことを明らかにした。NO による G-substrate のリン酸化と細胞内キナーゼの活性化が同時に起こることにより、キナーゼによりリン酸化されたタンパク質のリン酸化状態が増強される可能性が考えられる。

(2) G-substrate 遺伝子欠損マウスの作出とその解析 (遠藤, 鈴木; 池田, 糸原 (BSI 行動遺伝学技術開発チーム); 永雄 (BSI 運動学習制御研究チーム); 伊藤 (BSI 記憶学習機構研究チーム); 山田 (BSI リサーチリソースセンター))

上記 (1) の結果をもとにして、小脳における G-substrate の生理的役割を明らかにするために、G-substrate 遺伝子欠損マウスの作出およびその表現形の解析を各種の行動解析の面から行った。G-substrate 遺伝子欠損マウスにおいては、一般の行動には変化が見られなかった。しかし、小脳依存性の行動である視機性眼球反射順応において、短期順応は全く影響を受けないが長期順応が特異的に傷害されることが明らかとなった。現在、小脳 LTD に対する影響を解析すべく、電気生理学的な解析を行っている。

(3) 前述 (1) および (2) の結果を解釈するためには G-substrate と他のタンパク質との相互作用を明らかにするこ

とは大きな助けとなる。相互作用するタンパク質を明らかにするために、酵母 2-ハイブリッドシステムを用いて G-substrate と相互作用するタンパク質のスクリーニングを行い、いくつかの候補タンパク質を得た。現在これらのタンパク質について詳細にその生化学的性質を検討中である。

2. 長期神経可塑性に関与する細胞内分子機構の解析

長期記憶および長期記憶を担うと考えられている長期神経可塑性には遺伝子の転写翻訳を伴う新しいタンパク質の合成が必要であるが、これら長期の神経細胞の性質の変化に伴う遺伝子発現変化の同定はほとんど行われていない。そこで我々は、小脳 LTD, および小脳依存性の記憶を標的として、遺伝子発現に関与すると考えられる遺伝子をプルキンエ細胞特異的に欠損したマウスを作出して、それらの解析を試みている。

(1) 最初期遺伝子 JunB 遺伝子欠損マウスの作出とその特徴付け (鈴木, 遠藤; 池田, 糸原 (BSI 行動遺伝学技術開発チーム); 伊藤, Karachot (BSI 記憶学習機構研究チーム))

小脳 LTD に伴い最初期遺伝子 JunB の発現が誘導されることが以前から明らかとなっていた。JunB が LTD に果たす生理的役割およびその小脳依存性記憶における役割を明らかにするために、JunB をプルキンエ細胞特異的に欠損するマウスを作出した。JunB を全身で欠損したマウスは作出されたが、胎生致死であるため、その解析は不可能であった。Cre-loxP システムを用いて作出した JunB をプルキンエ細胞特異的に欠損したマウスは致死ではなく、成体における JunB の役割の解析が可能である。現在、このマウスを用いて小脳 LTD に対する影響、小脳依存性記憶に対する影響を詳細に解析している。

(2) MAP キナーゼ ERK2 遺伝子欠損マウスの作出とその特徴付け (鈴木, 遠藤, 瀧嶋 *, 佐藤 *; 池田, 糸原 (BSI 行動遺伝学技術開発チーム))

様々な外界からの刺激を細胞に伝える MAP キナーゼは記憶や学習の機構にも重要な役割を果たす。MAP キナーゼの中でもそのプロトタイプとして重点的に研究されてきた ERK1/2 は神経組織を含む全ての細胞で発現しており、また、ERK2 遺伝子欠損マウスは胎生致死である。そこで、我々は Cre-loxP システムを用いて ERK2 をプルキンエ細

胞特異的に欠損させた。このようにして作出したマウスは胎生致死ではなく、かつ、プルキンエ細胞特異的に ERK2 を欠損していることを明らかにした。今後、このマウスを用いて小脳 LTD や小脳依存性記憶に対する影響について解析する。

3. 情動記憶と関与する遺伝子の解析

恐怖のような情動記憶は一回の条件付けだけで一生続くような記憶が形成される非常に特異な記憶である。そのため、情動記憶は長期記憶の非常にいいモデルと考えられている。情動記憶を担う神経可塑性と記憶の分子機構を同定するために我々は、チロシンキナーゼ Fyn と CRE に結合する転写因子 ICER をとりあげ、遺伝子改変マウスを作出してその生理的役割の解析を行っている。

(1) チロシンキナーゼ Fyn 遺伝子改変マウスの解析 (児島, 遠藤)

シナプスに豊富に存在するチロシンキナーゼ Fyn はシナプス可塑性などのシナプス機能に重要であると考えられている。我々は Fyn を過剰発現するマウスを作出し、恐怖条件付けに対する影響を詳細に解析した。音-依存性の恐怖反応 (フリージング) は Fyn を過剰発現することで減弱した。しかし、NMDA 受容体のサブユニットである NR2B の阻害剤投与が、Fyn 過剰発現マウスの減弱した恐怖反応を回復した。さらに、Fyn 過剰発現マウスでは NR2B のチロシンリン酸化が亢進していることが観察された。これらの結果は、Fyn 過剰発現により NR2B のチロシンリン酸化が亢進し音-依存性の恐怖反応を抑制したと考えられる。NR2B 阻害剤はリン酸化により亢進した NR2B の機能を抑圧することが音-依存性の恐怖反応を回復したと考えられる。Fyn は音-依存性の恐怖条件付けに重要な働きをすると考えられる。

(2) 転写因子 ICER の機能解析 (児島, 遠藤)

CRE (cAMP-responsive element) に関連する一群の転写因子群はアメフラシ、ショウジョウバエ、線虫などの無脊椎動物や各種の脊椎動物において長期記憶の強化に関与することが明らかにされている。しかし、脊椎動物の記憶の強化において CRE の制御に関与する分子機構の研究は未知である。我々は既に、神経可塑性のモデルと考えられるキンドリングや長期記憶のモデルである恐怖条件付けにおいて、ICER (inducible cAMP early repressor) の発現が一過的に上昇することを見いだしている。そこで、我々は ICER を過剰発現したマウスと ICER 遺伝子を欠損したマウスを作り出して、これらの遺伝子改変がキンドリングや恐怖記憶に与える影響を詳細に検討している。

* 所外研究協力者

One of the fundamental questions in the field of neuroscience is to understand the molecular mechanisms underlying the functions of neurons and glial cells in the central nervous system. The roles of the molecules involved in the cascade are still waiting to be revealed. I have been continuing to attack the biochemical and cellular aspects of neuronal plasticity as a model of brain function. Further, we are extending the project to examine the effect of one-gene

modifications on learning and memory. We are dissecting the signal transduction cascade involved in neuronal plasticity in two categories; early phase neuronal plasticity and long-lasting phase (late phase) neuronal plasticity. The latter requires newly synthesized proteins through gene transcription and translation. Using biochemical, molecular biological and gene targeting techniques, we are attacking primarily on the events inside cerebellar Purkinje cells during early and late phase neuronal plasticities. We also deal with the molecular mechanisms underlying emotional memory such as fear, which is an excellent model for long-term memory. We are intensively attacking the mechanisms through the function of inducible cAMP early repressor (ICER), an immediate early gene product, and also tyrosine kinase Fyn by using gene-manipulation in mice.

1. The function of a NO (Nitric oxide)-cGMP-PKG (cGMP-dependent protein kinase) pathway in cerebellar LTD

G-substrate was identified as a substrate of PKG by Paul Greengard's group in the early 80's. Since then, the molecular cloning of the G-substrate cDNA has not been successful. Previously, we carried out the following researches: successful cloning of the G-substrate cDNA for rat, mouse and human; generation of a variety of tools such as cDNA probes, antibodies, and G-substrate mutants; identification of protein phosphatase inhibitory activity of G-substrate upon phosphorylation of the protein by PKG; the shuttling of G-substrate between the nucleus and cytosol in Purkinje cells; generation of G-substrate gene deficient mice. The homozygote mice mated normally, and no apparent ataxia was observed. However, the homozygote mice lacked cerebellar LTD. We further characterized the mice for general behaviors and also for cerebellar-dependent learning such as rotor-rod test, eye-blink conditioning, and VOR (vestibulo-ocular reflex) and OKR (optokinetic reflex) adaptation. General behaviors of the mice are normal, however, the long-term adaptation of OKR of eye movement was impaired without any affect on short-term adaptation of OKR.

2. Long-lasting neuronal plasticity and signal transduction cascades

We have generated the mice with the floxed JunB gene. JunB is an inducible transcription factor that binds to c-Fos to yield the AP-1 complex. We also characterized mice expressing Cre DNA recombinase in cerebellar Purkinje cells in adult animals. Mating the floxed JunB mice with the mice expressing Cre in Purkinje cells yielded the mice deficient in JunB only within the Purkinje cells. A previous study showed that a null knockout of JunB resulted in a lethal phenotype, however, our system could avoid the lethal phenotype and the mice survived following removal of the JunB gene at adult stage. Furthermore, the mice did not show any apparent ataxia. We are further analyzing the mice for LTD induction and for cerebellar-dependent behaviors such as adaptation in eye movement.

ERK2, a member of the MAP kinase family, plays an essential role in LTP in the hippocampus and also in cerebellar LTD. In addition, it plays a major role in the memory of *Aplysia*, *Drosophila* and *C.elegans*. Further, we have proved the close association of the NO pathway and the ERK pathway in cerebellar LTD. The role of ERKs is thought to not only be the phosphorylation of cytosolic proteins upon activation but also the regulation of transcription after activated ERKs have translocated into the cell nuclear. ERKs are assumed to be essential in cere-

bellar LTD and cerebellar-dependent memory. We have generated the mice lacking the ERK2 gene specifically in Purkinje cells using the Cre-loxP system. We proved that the mice lack the ERK2 protein only in the Purkinje cells. We are currently analyzing a variety of behaviors for the mice, especially cerebellar-dependent memory such as eye-blink conditioning. Hopefully, this conditional knockout technique will provide the clue for cerebellar-dependent long-term memory, which cannot be examined using the null knockout technique because ERK2 null knockout mice are embryonically lethal.

3. Emotional memory and genes

The non-receptor type protein tyrosine kinase Fyn is enriched in synapses and is thought to be crucial for synaptic function such as synaptic plasticity. We generated Fyn-overexpressing mice and analyzed for conditioned fear responses of these mice to clarify the role of Fyn in learned emotional behavior. Tone-dependent conditioned freezing was significantly attenuated in Fyn-transgenic mice. However, ifenprodil, a NR2B antagonist, restored tone-dependent freezing in Fyn-transgenic mice at a dose that did not affect freezing in wild-type mice. The results suggest that impairment of tone-dependent conditioned freezing in Fyn-transgenic mice is caused by disruption of the NR2B-containing NMDA receptor function. Tyrosine phosphorylation of brain proteins, including NR2B, was enhanced in Fyn-transgenic mice compared to that in wild-type mice. We found that ifenprodil significantly suppressed this enhanced protein Tyr phosphorylation. Thus, the NMDA receptor activity is tightly correlated with protein tyrosine phosphorylation, and Fyn might be a key molecule to control tone-dependent conditioned freezing through the regulation of NMDA receptor function.

Long-lasting neuronal plasticity as well as long-term memory, is an event that requires *de novo* protein synthesis through nuclear transcriptional activation. The importance of gene regulation through CRE (Cyclic AMP Response Element)-mediated transcription is well established for memory consolidation in a variety of animals including *Aplysia*, *Drosophila*, *C. elegans*, and vertebrates. However, the role of such inducible genes on neuronal plasticity and memory consolidation remains unknown. We previously found that inducible cAMP early repressor (ICER) was increased transiently in the brain after kindled seizure and after fear conditioning. ICER is a member of the cAMP response element-binding transcription repressors. We generated two types of ICER-mutant mice, ICER-overexpressing transgenic mice and ICER-knockout mice

to understand the functional role of ICER in kindling and fear memory. We are currently examining the behavioral phenotype of these mice in detail.

Staff

Unit Leader

Dr. Shogo ENDO

Staff Scientists

Dr. Nobuhiko KOJIMA

Technical Staff I

Ms. Masako SUZUKI

RIKEN/BSI Collaborators

Dr. Toshio IKEDA (Lab. Behav. Genet., BSI)

Dr. Masao ITO (Lab. Mem. Learn., BSI)

Dr. Shigeyoshi ITOHARA (Lab. Behav. Genet., BSI)

Dr. Laddawan KARACHOT (Lab. Mem. Learn., BSI)

Dr. Thomas LAUNEY (Lab. Mem. Learn., BSI)

Dr. Soichi NAGAO (Lab. Mot. Learn. Control, BSI)

Dr. Kazuyuki YAMADA (Adv. Technol. Dev. Group, BSI)

Outside collaborators

Dr. Kunio TAKISHIMA (Natl. Defense Med. Coll.)

Dr. Yasushi SATOH (Natl. Defense Med. Coll.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Michishita M., Ikeda T., Nakashiba T., Ogawa M., Tashiro K., Honjo T., Doi K., Itohara S., and Endo S.: "Expression of *Btcl2*, a novel member of *Btcl* gene family, during development of the central nervous system", *Dev. Brain Res.* **153**, 135–142 (2004). *