

条件的遺伝子操作研究チーム

Laboratory for Development of Conditional Gene Manipulation Techniques in Mouse and Their Application for the Studies of Memory

チームリーダー 利根川 進

TONEGAWA, Susumu

研究の目的は、昨年と同じである。我々は、特定の1ないし複数の遺伝子を条件的に操作した新しいマウスの系統を作製し、分析することによって、学習および記憶の基礎となる分子、細胞、ネットワーク、システムのメカニズムに関する研究を継続した。

1. 組織もしくは細胞種特異的な遺伝子操作

(1) 海馬のCA3野錐体細胞に特異的な遺伝子操作

我々は、パターン・コンプリーションによる記憶再生における海馬CA3野のNMDA受容体(NR)の役割に関する研究を既に発表している。この研究は、NR遺伝子の1つであるNR1を成熟したマウスのCA3野の錐体細胞においてのみ特異的に欠失させている、CA3-NR1ノックアウトの系統を多面的に分析することによって遂行された。同じノックアウトマウスを用いることにより、我々はわずか1回の試行で、空間記憶の迅速な獲得においてCA3NRが重要な役割を果たすことも証明した。この特異的な行動障害の生理学的な相関物は、ある動物が新しい環境に遭遇した際に空間的に同調する特性が乏しい細胞として、CA3の下流のCA1において同定された。この研究は投稿され、現在審査を受けている。

(2) 前前頭皮質(PFC)の深層錐体細胞に特異的な遺伝子操作

過去12ヵ月間に、この研究プロジェクトについては大きな進展がなかった。しかし、D5(ドーパミン受容体5型)BACクローンによってCre遺伝子の発現が引き起こされるプラスミドを新たに構築するところまで戻り努力し始めた。PFCは、主要なD5の発現部位であり、このプラスミドのコンストラクトは、PFCを効果的に標的するCreトランスジェニック株の創出を可能にすると我々は期待している。

(3) 視床背側(DT)に特異的な遺伝子操作

DT- α 1G KOマウスの電気生理学的分析および行動分析が進行中である。

(4) 前脳に特異的な遺伝子操作

出生後の前脳に対するCre/loxP組み換えを目的とするCreトランスジェニック株(これらの株はT29(遺伝的背景が混ざり合っている)およびCW2(純粋なC57/BL6遺伝的背景)と呼ばれている)を用いて、我々は2系統の組織特異的なノックアウトマウスを作出した。これらの系統のうちの1つは、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼIV(CaMKIV)に対するものであった。多面的な分析によってこのマウス系統を解析することにより、我々は、このキナーゼが神経活性依存的な転写や長期増強のタンパ

ク質合成依存様式、また、海馬依存性記憶の強化/保持において、重要な役割を果たすことを証明した。2つ目のノックアウトマウスは、MAPキナーゼ(ERK)に対するものであった。我々は、長期増強や記憶強化の際に、神経活性依存的な翻訳におけるMAPキナーゼ経路の新しい役割を証明した。この研究成果は投稿されたところである。

2. 条件的(空間的および時間的に制限された)遺伝子操作

(1) 逆テトラサイクリン転写活性化因子(rtTA)法に基づく方法

ある研究室(Isabella Mansuy スイス連邦工業大学)はこのシステムが機能すると主張しているが、我々も含めた多数の研究室は、彼女らの発見を再現するか、このシステムを用いて信頼性の高い有用な誘導を実現するか、いずれかの問題を抱えている。一連の入念な実験を行って、我々は、この問題の核心が、血液-脳関門(BBB)からのドキシサイクリン(DC)の浸透が不十分なことによって、脳へのDCの輸送効率が悪くなっていることにあることを示した。脳室内に直接的に薬物を急性注入したとき、脳室に近い海馬領域でGFPリポーター遺伝子が強固に誘導された。この結果は、埋め込んだミニポンプによってDCを長期にわたって供給することで、最終的には問題を克服するかもしれないことを示唆する。現在、我々はこの仮説を高度集束超音波を使用するなどのBBBの浸透性を変化させるその他の非侵襲的方法を用いて検証中である。

(2) CA3または歯状回(DG)特異的な条件的遺伝子操作
rtTA誘導システムが遭遇した問題が最終的には克服されると仮定して、我々は、CA3およびDGを標的とした誘導可能な遺伝子操作システムを開発中である。この目的のために我々は、トランスジェニックマウスの作製を進めている。このマウスでは、rtTAの脳の広範囲での発現(LSL rtTAと呼ぶ)がCre/loxP組換えシステムに依存している。既にCA3-CreおよびDG-Creトランスジェニック系統(我々の共同研究者から入手した)を持っているため、それぞれの細胞種特異的にrtTAを発現させるには、これらのCre系統にLSL rtTAマウスを交配するという問題がある。

1. Tissue or cell type-specific gene manipulation

(1) Hippocampal CA3 pyramidal cell-specific gene manipulation

We have 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 a multifaceted analysis of a mouse strain CA3-NR1 KO in which an NR gene, NR1, was specifically deleted only in the CA3 pyramidal cells of an adult mouse. Using the same cell type-specific knockout mice, we also demonstrated that CA3 NR plays a crucial role in rapid acquisition of spatial memory with just one trial. Physiological correlates of this specific behavioral impairment was identified in CA1, downstream of CA3, as place cells with poorer spatial tuning properties upon an animal's encounter with a novel environment. This work has been submitted and is currently under review.

(2) Prefrontal cortex (PFC) deep layer pyramidal cell-specific gene manipulation

We did not make much progress on this project during the past 12 months. However, efforts were initiated to go back to a new construction of plasmids in which the expression of the Cre gene will be driven by a D5 (dopamine receptor type 5) BAC clone. PFC is the major site of D5 expression and this plasmid construct, we hope, will allow the generation of an effective PFC-targeted Cre transgenic line.

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

Electrophysiological and behavioral analysis of DT- α 1G KO mice are in progress.

(4) Forebrain-specific gene manipulation

Using a Cre transgenic line that targets Cre/loxP recombination to the postnatal forebrain (the lines are called T29 (mixed genetic background) and CW2 (pure C57/BL6 genetic background)), we generated two tissue-specific knockout mouse strains. One of these strains was for Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMKIV). By analyzing this mouse strain by multifaceted methods, we demonstrated that this kinase plays a crucial role in neural activity-dependent **transcription**, the protein synthesis-dependent form of LTP (L-LTP) and in the consolidation/retention of hippocampus-dependent memory. These findings were published in Kang *et al.* The second postnatal forebrain restricted knockout was for a MAP kinase ERK. We demonstrated a novel role of the MAP kinase pathway in neural activity-dependent **translocation**, in L-LTP and memory consolidation. This work has been submitted to *Cell* for publication.

2. Conditional (spatially and temporally restricted) gene manipulation

(1) Reverse tetracycline transactivator (rtTA)-based method

Although one laboratory (Isabella Mansuy) claims that this system works, many laboratories, including our own, have had a problem in either reproducing their findings or in accomplishing a reliable and useful induction with this system. With a series of painstaking experiments, we have demonstrated that the core of the problem is in an inefficient delivery of doxycycline (DC) to the brain due to insufficient penetration of DC through blood-brain barriers (BBB). When we made an acute injection of the drug directly into the ventricles, there was a robust induction of the GFP reporter gene in the area of the hippocampus proximal to the ventricles. This suggests that a chronic supply of DC by implanted mini-pumps may finally overcome the problem. We are testing this hypothesis along with other, noninvasive, methods to altering the permeability of the BBB, such as the use of high-intensity focused ultrasound.

(2) CA3 or dentate gyrus (DG)-specific conditional gene manipulations

Assuming that the difficulties encountered with the rtTA induction system will eventually be overcome, we are developing CA3-targeted and DG-targeted inducible gene manipulation systems. For this purpose, we have produced a transgenic mouse in which the brain-wide expression of rtTA (referred to as LSL rtTA) is dependent on Cre/loxP recombination. Since we already have CA3-Cre and DG-Cre transgenic lines (supplied by our collaborators), it is a matter of crossing the LSL rtTA mouse to these Cre lines to confer the respective cell type-specificity to the expression of rtTA.

Research Subjects and Members of Laboratory for Development of Conditional Gene Manipulation Techniques in Mouse and Their Application for the Studies of Memory

1. Development of tissue or cell type-specific gene manipulation for studying learning and memory mechanisms
2. Development of conditional gene manipulation techniques for studying learning and memory mechanisms

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

Graduate Students

Mr. Arvind GOVINDARAJAN

Technical Assistants

Mr. Sean PERRY

Dr. Lorene LEITER

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

Huang J. Z., Yu W., Lovett C., and Tonegawa S.: "Cre/loxP recombination-activated neuronal markers in mouse neocortex and hippocampus", *Genesis* **32**, 209–217 (2002). *

Nakazawa K., Quirk M. C., Chitwood R. A., Watanabe M., Yeckel M. F., Sun L. D., Kato A., Carr C. A., Johnston D., Wilson M. A., and Tonegawa S.: "Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall", *Science* **297**, 211–218 (2002). *

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Shutoh F., Kato A., Oki M., Tonegawa S., Itohara S., and Nagao S.: “Functional diversity of protein kinase C family revealed by the alteration of retinal slip dependency in the adaptation of mouse horizontal optokinetic response (HOKR) eye movement”, 32nd Ann. Meet. of

Soc. for Neuroscience, Orland, USA, Nov. (2002).

(国内会議)

首藤文洋, 加藤明, 大木雅文, 糸原重美, 利根川進, 永雄 総一: “PKC γ ノックアウトマウスの眼球運動学習における PKC α と PKC γ の機能の特徴”, 第 25 回日本神経科学大会, 東京, 7 月 (2002).