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

我々の研究目的は、以前と同じで変わっていない：すなわち、分子、細胞、神経回路網、および学習と記憶の基底にある神経系機構の研究を特定の1つの遺伝子または複数の遺伝子を条件操作したマウスの新系統を創成し、分析することによって行うこと。この目標達成のため、我々は以下の2つの一般的なアプローチを採用した：(1) 学習および記憶機構を研究するため組織または細胞型・特異的遺伝子操作の開発、(2) 学習および記憶機構研究のため条件遺伝子操作手法の開発。

1. 組織または細胞型—特異的遺伝子操作

(1) 海馬 CA3 錐体細胞特異的遺伝子操作

我々は、パターン形成完了により記憶想起で海馬 CA3 NMDA レセプター (NR) が果たす役割に関する研究を以前発表した。この研究は NR1 遺伝子欠失を海馬の CA3 錐体細胞に限定したマウスの血統を作ったものである。同一の突然変異マウスに関してその後行った研究により、これらの突然変異体は、空間リファレンス記憶が正常である間に、僅か1つの実験後の空間記憶の急速な記憶（すなわち、エピソード様記憶）で障害があったことが確認された。複数電極記録手法を用いて行った実験は、行動研究からのこれらの結果を確認付けるものであった：突然変異 CA1 場所細胞の空間的調整は、慣れた環境では正常であったが、新しい環境では著しく障害を受けた（例、拡大レース・フィールドと総合放出速度）。我々は、状況によって決まる恐怖条件づけ作業実験を利用し、一層の行動特性化によって、上記の所見を拡大して来た。現在の結果は、急速な結合的、状況表象を形成する CA3-NR1KO マウスの能力障害に一層の光を当てることになった。マウスには脚にショックを与える前の状況を探るため一定の限られた時間 (< 60 秒) を与えた場合、当該突然変異マウスは 24 時間後の恐怖の記憶は少なくなっていることが確認された。さらに、我々は突然変異マウスでの海馬の全体的活性の特徴づけの研究を続けているが、複雑さが増大する新しい空間環境の探索と、交互に組み合わせた睡眠時間帯の両方で、すべての海馬のサブフィールドでの細胞および回路網活性 (CA1, CA3, DG) を同時に調べることによって行っているものである。

(2) 海馬 DG 顆粒細胞特異的遺伝子操作

ハーバード大学医学部の Dr. Nina Balthasar と Prof. Bradford Lowell と共同して、我々は新しい NR1 ノックアウト・マウスを作ったが、このマウスの遺伝子欠失は成熟マウス (DG-NR1KO マウス) の海馬の歯状回 (DG) 顆粒細胞に限定したものである。このノックアウト・マウスの作成はプロオピオメラノコルチン (POMC) からの転写プロモーターによって Cre 発現が動因となって生じる Cre-loxP 系を用いて行った。我々は、LTP がこれらの突然変異マウスの貫通路 (PP)-DG シナプスで特異的に欠失していることを

生体内記録で確認した。CA1-NR1KO マウスとは対照的に、DG-NR1KO マウスは、Morris の水迷路の台を隠した場合では正常であったが、このことは PP-DG シナプスでのレセプター依存性可塑性が空間リファレンス記憶にとって必ずしも必要としないことを示すものである。これらのマウスには非常に多くの空間学習および状況記憶試験を行ったが、これらの試験には、DMZ 水迷路、状況恐怖条件付け、それに我々の新しい作業実験であるワゴン輸送路も入っている。我々は、これらの様々なプロトコルを通して微妙な学習欠損について解明の途上であり、状況識別と空間情報の初期獲得の DG 可塑性の役割を明らかにして来ている。さらに、我々は複数電極記録手法を用いて新しい環境および慣れた環境の両方で、CA1 場所細胞の活性をモニターして来た。初期の結果によると、これらのマウスは、CA3-NR1KO マウスと非常に似ているが、新しい環境では場所表象で障害を受けていたかも知れないことが示されている。

(3) 皮質および海馬特異的遺伝子操作

(i) p21 活性キナーゼ (PAK) 信号

ドミナントネガティブ PAK 遺伝子組換え (dn PAK TG) マウスから得られた我々の以前の結果から、皮質のシナプス形態と可塑性、それらと長期記憶強化との間に決定的な関係のある証拠が得られた。我々は、この研究を皮質シナプス形態および可塑性で決定的な役割を果たす遺伝子である脆弱 X 知的遅滞 1 (*FMR1*) にまで拡大した。非常に印象的であったのは、*FMR1* ノックアウト (KO) マウスと dn PAK TG マウスが皮質棘形態とシナプス可塑性において対立表現型を示したことである。我々は、このことに基づき;*FMR1* および *PAK* によって介在される信号経路がシナプス形態と機能の調節において相互に拮抗する可能性があるという仮説を立てることになった。我々は、二重突然変異マウスである *FMR1* KO, dnPAK TG マウスを分析することにより、*PAK* と *FMR1* 間に遺伝子相互作用があるのか否かを調べた。*FMR1* KO, dnPAK TG マウスでは、皮質ニューロンの平均棘の大きさは野生型マウスと類似であったが、dnPAK TG マウスとは有意に異なっていた。この結果は、*FMR1* の喪失が dnPAK TG マウスの棘の大きさの異常性をレスキューすることを示すものであり、

PAK と *FMR1* 間の遺伝子相互作用を示唆するものである。我々は、二重突然変異マウスでの棘数、電気生理学および行動分析を行うことにより、この遺伝子相互作用をさらに詳しく調べる予定である。

(4) 背側視床 (DT) 特異的遺伝子操作

感覚信号伝達は、ほ乳類の睡眠中に阻害されることが長年に亘って疑われて来た。我々は、*Cav3.1* T 型 Ca^{2+} チャンネル電流が睡眠を促す視床感覚伝達を阻害するという仮説を立てた。T 型 Ca^{2+} チャンネル活性は WT の視床投射ニューロンでの活性電位放電を阻止する (> 9 秒) が、*Cav3.1* ノックアウト・マウスでは阻止しないことを我々は確認した。阻害は、シナプス伝達がブロックされて発生するが、細胞内 Ca^{2+} の増加を必要とした。さらに、Cre/loxP 組換え法を用いて吻側一中線視床から遺伝子コード化 *Cav3.1* を焦点欠失させると、頻回で長時間の覚醒をもたらす。ただし、この覚醒は睡眠を断片化し抑制した。興味深いことであるが、睡眠は *Cav3.1* を皮質錐体ニューロンから切除したときに障害を受けた。これらの所見は、視床 T 型 *Cav3.1* チャンネルが視床経路で覚醒信号伝達をブロックし、睡眠を安定させるのに必要である、という仮説を裏付けるものである。

2. 条件 (空間的および時間的制限) 遺伝子操作

(1) 結合 Cre およびテトラサイクリン・トランス活性 (tTA) に基づく方法

我々は、研究室で数匹の組織特異的または細胞型特異的 Cre トランスジェニック・マウスを飼って創成したことがある。組織または細胞型制限遺伝子操作に対し時間的調節を行うため我々は、loxP-stop-loxPtTA トランスジェニック「コンバーター」システムを創成した。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、またその結果得られる二重トランスジェニックシステムを第三のトランスジェニック・マウスと交配させることであるが、この場合、遺伝子の発現は O-tet 終末プロモーターの調節下におく。この結果得られた三重トランスジェニック・マウスでは遺伝子発現の局所および時間双方の調節を行うことができる。この興味のある遺伝子は、野生型 (この場合過発現が可能である)、ドミナントネガティブ型 (この場合、内性遺伝子を阻害することがある) あるいは、構成的活性型 (この場合、遺伝子発現の脱調節が可能である) になり得る。我々は、いくつかの異なるプロモーターを用い、loxP-stop-loxPtTA 導入遺伝子の発現を促し、その結果得られたマウスを CA3-特異的 Cre または DG 特異的 Cre マウスと交配させ、さらに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り、tTA の細胞型特異的発現を評価した。その結果、tTA の強力な細胞型制限発現と GFT リポーターのドキシサイクリン調節発現を観察することができた。リポーター発現はドキシサイクリン抑制後に誘発することができる。我々は、現在この手法を破傷風毒素タンパク質を発現する tetO-調節システムに適用しているところであるが、このタンパク質は VAMP2 を切断し、それによってシナプス前部終末からの神経伝達物質遊離を阻害する。我々の計画としては、Schaffer の側枝またはコケ状突起などの、特異的興奮性シナプス前部終末からの神経伝達物質遊離を一次的かつ可逆的に阻害し、それによって学習および記憶での特異的興奮性海馬回

路の機能について演繹することである。

1. Tissue or cell type-specific gene manipulation

The further study of the role of hippocampal plasticity in the various subregions will continue. We are currently utilizing our novel wagon wheel task to simultaneously monitor both behavioral learning and place cell activity (via ensemble recording) in the CA1-NR1 KO, CA3-NR1 KO, and DG-NR1 KO mice to better understand how the hippocampal code for space uses plasticity to guide behavior. Also ongoing are a variety of fear conditioning paradigms that would test the non-spatial pattern completion and pattern separation capability of these mutant mice.

For the forebrain-specific dominant negative PAK transgenic mice, we hope to gain a better understanding of the genetic and functional interactions between *FRM1* and PAK and how the structural plasticity they regulate underlies learning and memory.

Finally, we will continue to expand our studies on plasticity and learning by studying the role of NR-dependent plasticity in the dopaminergic neurons of the VTA. Using Cre lines currently under characterization, we can delete the NR1 gene specifically in these cells, with the hope of gaining insight into the role of synaptic plasticity in VTA neurons in reward-driven learning and in drug addiction.

2. Conditional (spatially restricted and temporally inducible) gene manipulation

We will attempt to complete the three mouse crossing technologies described above and identify the function of specific hippocampal subregions and circuitries, as well as receptors (e.g., NMDA receptors) and enzymes (e.g., protein kinases and protein phosphatases) therein, in specific aspects and types of hippocampus-dependent learning and memory. The ability to reversibly inactivate specific excitatory circuits in the hippocampus will give us a much greater understanding of the computational contribution of each of the hippocampal subregions to learning and memory.

Staff

Principal Investigator

Dr. Susumu TONEGAWA

Research Scientists

Dr. Thomas MCHUGH

Dr. Toshiaki NAKASHIBA

Postdoctoral Associates

Dr. Matthew ANDERSON

Dr. George DRAGOI

Dr. Mansuo HAYASHI

Dr. Inbal ISRAELY

Dr. Patrik KUNZLER

Dr. Cecile SPIELEWOY

Dr. Inbal ISRAELY

Technical Assistants

Mr. Frank BUSHARD
Ms. Lorene LEITER
Ms. Ana OJEDA
Mr. Sean PERRY
Ms. Carrie RUIT
Mr. Michael RAGION
Mr. Wenjiang YU

誌 上 発 表 **Publications**

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Kelleher III R. J., Govindarajan A., Jung H., Kang H.,
and Tonegawa S.: “Translational control by MAPK sig-
naling in long-term synaptic plasticity and memory”,
Cell **116**, 467–479 (2004). *

Hayashi M. L., Choi S., Shankaranarayana Rao B. S.,

Jung H., Lee H., Zhang D., Chattarji S., Kirkwood A.,
and Tonegawa S.: “Altered cortical synaptic morphology
and impaired memory consolidation in forebrain-specific
dominant-negative PAK transgenic mice”, *Neuron* **42**,
773–787 (2004). *

Anderson M. P., Mochizuki T., Xie J., Fischler W., Manger
J. P., Talley E. M., Scammell T. E., and Tonegawa S.:
“Thalamic Ca_v3.1 T-type Ca²⁺ channel plays a crucial
role in stabilizing sleep”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
102, 1743–1748 (2005). *

(総説)

Nakazawa K., McHugh T. J., Wilson M. A., and Tonegawa
S.: “NMDA receptors, place cells and hippocampal spa-
tial memory”, *Nature Rev. Neurosci.* **5**, 361–372 (2004).
Kelleher III R. J., Govindarajan A., and Tonegawa
S.: “Translational regulatory mechanisms in persistent
forms of synaptic plasticity”, *Neuron* **44**, 59–73 (2004).