

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2009～2011

課題番号：21200006

研究課題名（和文）

脳部位特異性の極めて高い遺伝子ノックダウンマウスの新規作製法の開発とその応用

研究課題名（英文）

Establishment of a technique to generate highly brain region specific gene knockdown mouse and its application

研究代表者

城山 優治 (KIYAMA YUJI)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：90456195

研究成果の概要（和文）：我々は異なる脳内発現特性を示す2種類のトランスジェニックマウスを用い、その重複領域に限定された遺伝子ノックダウンを試みた。最初に、恐怖記憶に関係する脳領域である扁桃体に特異的な遺伝子ノックダウンを目指した。CamKII、GRPの二つの遺伝子が共に発現する脳領域は、ほぼ扁桃体のみである。そこで、その領域のみに、NMDA受容体の遺伝子発現を抑制する機能を持つmiRNA発現マウスを作成した。交配したマウスにおける遺伝子発現解析を現在進行中である。

研究成果の概要（英文）：We tried to establish a technique to generate highly brain region specific gene knockdown mouse. For this purpose, we used two types of transgenic mouse which express their transgenes in different manners in their brain. Amygdala is involved in fear memory. Because both CamKII and GRP are coexpressed only in the amygdala, we tried to generate amygdala specific gene knockdown mice using these genes' promoters. We have generated transgenic mice which express miRNA that downregulate the NMDA receptor only in the amygdala. We are analyzing the expression level of the target gene in the mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2010年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
年度			
年度			
総計	22,700,000	6,810,000	29,510,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：扁桃体、miRNA、NMDA受容体

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の個体における遺伝子機能の解析は、主にマウスをモデルとした標的遺伝子組み換え法により行われてきた。脳機能の解析を目的とした研究では、1992年のSilvaらの α CamKII遺伝子欠損マウスの報告が最初になる(1)。しかし、単純な遺伝子欠損はしばしば発育に影響を及ぼすため、成体における学習・記憶、情動および運動機能等の高次機能の解析においては限界があった。また、脳は部位による機能分化が著しいこともあり、詳細な脳機能の解析においては部位特異的な遺伝子欠損マウスを作成する必要があるがあった。そのため、1996年に発表された海場 CA1 野特異的な遺伝子欠損マウスを始め(2)、Cre-loxP システムを用いた脳部位特異的な遺伝子欠損マウスを用いた研究報告が相次いだ。それらをここに全て記載することはできないが、海場の各領域、小脳のプルキンエ・顆粒細胞、線条体などの特異的な遺伝子改変マウスがこれまで報告されている。これらの研究の場合、遺伝子改変の脳部位特異性は、マウスの遺伝子プロモーターに依存する。しかしその数は有限であり、いつも都合の良い遺伝子プロモーターが存在するとは限らない。今後、任意の脳部位における遺伝子欠損マウスの作成は困難になっていくものと予測され、その状況を打破する技術の開発が待望されている。

References

- (1) Silva A.J., Stevens C.F., Tonegawa S. & Wang Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257, 201-206

(1992) 他

- (2) Tsien J.Z., Chen D.F., Gerber D., Tom C., Mercer E.H., Anderson D.J., Mayford M., Kandel E.R., Tonegawa S. Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87, 1317-1326 (1996) 他

2. 研究の目的

研究代表者の研究室では、学習・記憶における海馬機能の解析に加え、扁桃体を中心とした情動機能の電気生理学的・行動学的解析を進めている。海馬においては、既に CA1, CA3, 歯状回顆粒細胞などの特異的な遺伝子欠損マウスが作出され、各部位のシナプス可塑性の個体における役割が詳細に解析されている。一方、情動などに少なからぬ役割を果たすと予測されている扁桃体におけるシナプス可塑性は、海馬と同様のアプローチによる研究は未だに発表されていない。知られている限りの遺伝子プロモーターを検索したところ、扁桃体に比較的強く発現する遺伝子はあるにはある(3)。しかし、それ以外にも発現する領域が部分的にあり、更に幼若期や非神経系における発現は全く未知の状況にあり、単独で Cre のプロモーターとして用いるには不十分な点が多い。

そこで思い出したのが、キイロショウジョウバエにおける前後軸パターン形成に関わる転写因子タンパク質の遺伝子群の研究史である。詳細な説明は省略するが、ショウジョウバエを含む多細胞生物の前後軸は、単独の遺伝子では決まらない。複数の遺伝子発現の組み合わせによって初めて詳細なパターンが決定される。同様の原理は、この例に限らず、多細胞生物のあらゆる器官

形成に共通していると考えられる。そこで今回、遺伝子欠損マウス作成の際の部位特異性の確立にも応用できるのではないかと考え、着想に至った。

本研究計画では、扁桃体における NMDA 依存性シナプス可塑性の役割を、電気生理学的・行動学的に解明することを最終目的としている。これを通じて、これまで現象論的に扱われることがほとんどであった「情動」を、分子生理学的な立場から解析することにより、情動そのものだけでなくその高次脳機能や精神神経疾患との関連性までも明らかになると考えられる。

扁桃体における NMDA 受容体の役割については、アンタゴニストの局所注入実験などの薬理学的実験によりある程度進められている(4)。しかし、より長期的な遺伝子機能を解析するためには遺伝子改変動物の作成が必要となる。現状の遺伝子工学技術では扁桃体を含む任意の脳領域特異的遺伝子改変動物の作成は極めて困難であるため、その作成法の確立を第一段階の目標とする。

References

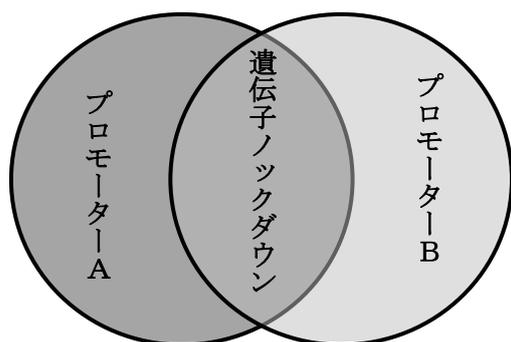
- (3) Shumyatsky G.P., Tsvetkov E., Malleret G., Vronskaya S., Hatton M., Hampton L., Battey J.F., Dulac C., Kandel E.R. Bolshakov V.Y., Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell* 111, 905-918 (2002)
- (4) Miserendino M.J., Sananes C.B., Melia K.R., Davis M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the

amygdala. *Nature* 345, 716-718 (1990) 他

3. 研究の方法

本研究計画遂行のための、手始めとして、扁桃体特異的な遺伝子ノックダウンマウスの作成を行う。その為に、Promotor A を用いた Cre マウスと、Promotor B を用いた loxP-miRNA マウスの、2種類の遺伝子導入マウスが必要となる。これによって、Promotor A と Promotor B が共に発現する部位のみにて miRNA が発現し、ターゲット遺伝子がノックダウンされる(図1)。今回、Cre マウスとして、既に他研究室で作成されている CamKII-Cre マウスを使用する。このマウスは、生後3週以降において、海場、扁桃体、大脳皮質などで Cre が発現することが確認されている。loxP-miRNA マウスとして、GRP 遺伝子のプロモーター下に、Cre-loxP recombination 依存的に NMDA 受容体を標的とした miRNA が発現されるノックインマウスを作成する。これらの交配によるダブルトランスジェニックマウスは、扁桃体特異的に3週以降で NMDA 受容体遺伝子が不活化されると予測される。作製・交配されたマウスを用いて、発現解析と、表現型解析を行う。発現解析においては、ウェスタン、qPCR, NMDA 電流の電気生理学的な測定を行う。表現型解析においては、電気生理学的・行動学的手法を用い、扁桃体における NMDA 受容体の個体における機能を解明する。

図 1



4. 研究成果

Cre recombinase 依存的な扁桃体特異的 miRNA 発現マウス (部位特異的遺伝子ノックダウンマウス)の脳内における NMDA 受容体のノックダウンレベルの解析を行なった。対象エリアである扁桃体は異なる細胞種が混在しており、今回のノックダウンマウスの miRNA は扁桃体内の Principal Neuron に限定されている事が想定される。そのため、mRNA 抽出等による分子生物学的な発現解析では、遺伝子ノックダウンされていないと想定される Interneuron における発現が混じる為、ノックダウンレベルの正確な判定が困難である。その為、ウェスタン解析、qPCR 解析に加え、電気生理学的解析を行なった。現在、Principal Neuron におけるターゲット遺伝子を対象とした電気生理学的解析によって、ノックダウンレベルの測定を行なっている。

研究機関の後半からは、新たな site-specific DNA recombinase である PhiC31o-attP/B システムを導入した部位特異的遺伝子ノックアウトマウスの作製を進めている。Cre-loxP システムと合わせて 2つの recombinase を用い、その組み合わせにより遺伝子ノックアウトの脳部位特異性を高める計画である。その為に、平成 22 年度から 23 年度にかけて PhiC31o 遺伝子

を導入した 5 サブラインのトランスジェニックマウスを作製し、導入遺伝子の発現解析を順次進めていた。うち 3 ラインまでの解析が終了しているが、導入遺伝子の発現パターンはいずれも上流プロモーターによって予想されたものとは異なっていた。現在、残り 2 ラインの解析を進めている途中である。

本研究計画は、従来の作製法では不可能と考えられていた脳部位特異性を実現する方法の開発を目的としている。本科研費研究種目(新学術領域研究(研究課題提案型))の目的に「確実な研究成果が見込めるとは限らないものの、当該研究課題が進展することにより、学術研究のブレークスルーをもたらす可能性のある、革新的・挑戦的な研究」とあるが、そのとおりの研究を進めてきた。成果発表はもう少し先になるが、引き続き解析を進行させ、本目的を達成させる予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[その他]

ホームページ等

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/NeuronalNetwork/Neuronal_Network/Index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城山 優治 (KIYAMA YUJI)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：90456195

研究協力者

小川 糸音 (OGAWA ITONE)
東京大学・医科学研究所・技術職員