

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700321

研究課題名(和文)コンディショナル遺伝子改変マウスを用いた記憶における海馬CA2領域の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the role of hippocampal CA2 region in memory by conditional targeting

研究代表者

阿部 学 (Abe, Manabu)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：10334674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：近年まで海馬CA2領域はその機能がほとんど未知であった。本研究の目的はCA2神経細胞の記憶に果たす役割の解明である。そこで、CA2選択的遺伝子改変のためCacng5、Rgs14、AbatなどCA2領域に強く発現することが知られている遺伝子を標的として翻訳開始点にDNA組換え酵素Creまたはテトラサイクリントランスアクチベーターを挿入したノックインマウスや、Cre活性またはテトラサイクリン誘導により神経細胞死を誘導できるマウスを作製した。本研究課題により作製された多数の遺伝子改変マウス系統は、今後、海馬と記憶の研究に極めて有用なツールとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The function of the hippocampal CA2 region remains largely unknown. The aim of this study was to examine the role of CA2 neurons in memory by conditional targeting. To develop a CA2 neuron-selective gene targeting system, we made several knock-in lines, in which Cre recombinase or tetracycline transactivator was inserted into the translational initiation site of the target genes (Cacng5, Rgs14, Abat and so on) in frame. The genes seem to be strongly expressed in the CA2 region. Additionally, we made a new line expressing diphtheria toxin receptor under control of the activity of Cre recombinase or the induction of tetracycline transactivator. The mutant lines developed in this study could be useful tools for functional analysis of hippocampus-dependent memory.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：海馬 コンディショナルジーンターゲティング法 記憶

1. 研究開始当初の背景

(1) 海馬は1934年にLorente de NoによりCA1、CA2、CA3として各領域を定義され、主に嗅内皮質II層より入力を受けた歯状回(DG)からCA3を介しCA1へ情報を伝達しさらに嗅内皮質へと戻る3シナプス性回路(DG-CA3-CA1)を構成している。この回路内での情報処理こそが空間学習等の記憶形成過程において最も重要であると考えられており、現在まで海馬の研究のほとんど全てはこの仮説に基づき行われている。その中で、最近までCA2に着目した専門的な研究はほとんど報告されてこなかった。近年、CA2-CA1の2シナプス性回路の発見や、Rgs14遺伝子やバソプレッシン1b受容体など、CA2に発現する遺伝子のKOマウスは海馬依存的学習やエピソード記憶、社会的行動が変化することが報告されている。以上のことから申請者はCA2神経細胞の神経生理学的特性や神経連絡を検証し、CA2を介した記憶学習の神経回路の基盤を明らかにすることが重要であると考えた。

(2) マウス生体における海馬CA2の機能解析にあたり、最大の問題点はその領域の狭さと形状にあると予想された。すなわちCA2は、海馬の横断面で見た時には非常に狭い領域ながらも長軸方向に沿って海馬全体に分布しており、生体内において選択的かつ領域全体で遺伝子操作を行う場合、CA2はウイルスベクターなどの適用に最も不向きな脳領域であると考えられた。申請者が過去に作製したマウスであるCacng5-iCreノックインマウスでは、遺伝子の発現様式から予想された通り、CA2に非常に強いCre活性が認められた。しかし他の細胞種にもCre活性が認められたため、本研究においてはこのCacng5遺伝子へrtTA及びtTSをノックイン(KI)したマウス(Cacng5-rtTA, tTS KIマウス)を作製する。また、CA2での発現特異性が極めて高いRgs14遺伝子を用いたRgs14-iCreノックインマウスは作製済みで、Cre活性の検証を行っていた。これら2系統をそれぞれテトラサイクリン(Tc)誘導系およびCre-loxP組換え系CA2選択的コンディショナル遺伝子改変マウス作製のための基本系統(ドライバーマウス)として使用する。

2. 研究の目的

(1) CA2-KOマウスの行動学的解析を行うことで、記憶学習や社会性行動において3シナプス性回路とは異なった2シナプス性回路の担う重要性を明らかにする。

(2) CA2の電気生理学的特性、特にNMDA受容体及びその下流のシグナルを介したシナプス可塑性の特性を検証する。さらにさらにトレーサー物質を用いてCA2を介する神経回

路網を明確にする。

3. 研究の方法

(1) Cre活性およびドキシサイクリン投与依存的に、シナプス伝達を阻害する破傷風毒素軽鎖(TeNT)や神経細胞死を誘導できるジフテリア毒素受容体(DTR)をCA2領域選択的に発現するマウスを作製し、電気生理学的解析、行動学的解析を行うことで、CA2神経細胞の神経生理学的特性や、記憶学習及び社会性行動における役割を明らかにする。記憶学習を評価する解析としては遺伝子改変マウス解析の実績豊富なモリス水迷路テストと恐怖条件付けテスト、社会性行動を評価する解析としては3チャンバーテストを実施する。

(2) シナプス伝達、可塑性に重要な分子(NMDA型グルタミン酸受容体GluN1サブユニット等)を標的として、CA2選択的なコンディショナルKOマウスを作製する。作製後、(1)と同様に行動学的解析を行う。

(3) Cre活性依存的に発現する順行性及び逆行性トレーサー物質によりCA2を介する神経回路網を可視化して明確にする。

4. 研究成果

本研究課題の主な成果として、CA2領域の解析に有用であると思われる多数の系統の遺伝子改変マウスを作製できたことがあげられる。ごく最近、国内外の研究から、CA2を介する神経回路や、社会性記憶に果たすCA2領域の重要性について示されたが(Kohara et al., Nat. Neurosci. 17, p. 269 - 279 (2014)、Hitti et al., Nature 508, p. 88 - 92 (2014))、依然としてCA2の生理機能の全貌が明らかになったとは言えなく、本研究課題により作製されたマウスは、今後の海馬と記憶学習の研究において必要不可欠のツールとなることが予想される。また、平成26年度より研究代表者は科学研究費(基盤研究(C)H26~H28、記憶と社会行動に果たす海馬CA2領域の機能解明)を受け、上記マウス系統を用いてCA2に極めて選択性の高いtTA発現マウスを作製し(図1)、今後さらに詳細にCA2の生理機能を明らかにしてゆく。

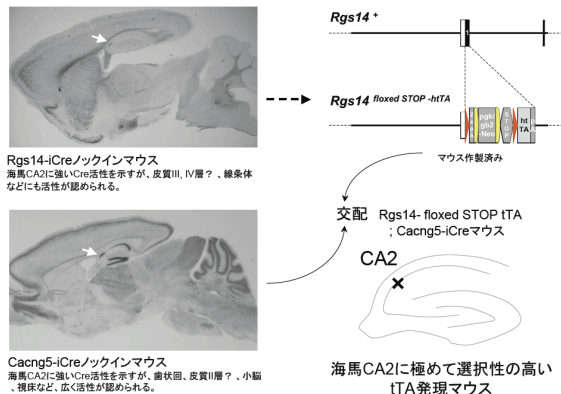


図1. 海馬CA2選択的tTA発現マウス作製方法

(1) ドライバーマウスとして用いる Cre 発現マウスについては、前述の Rgs14、Cacng5 遺伝子の他に、S100b、Abat 遺伝子を候補として iCre KI マウスを作製することができた。現在、iCre 活性の細胞種選択性などを検証しており、中でも S100b-iCre KI マウスについては、予想通りアストログリアと思われる細胞以外で選択的に海馬 CA2 領域に高い Cre 活性を持つことが示唆され、グリア細胞には発現せず神経細胞に発現する遺伝子のコンディショナル KO には非常に有用であることが期待された (図 2)。また、最初に作製した Cacng5-rtTA, tTS KI マウスについてはドキシサイクリンによる遺伝子発現誘導に成功しなかったため、さらに上記遺伝子への tTA KI マウス (Rgs14-htTA, S100b-htTA KI マウス) を作製し、tTA の発現選択性や薬剤誘導効率を検証している。

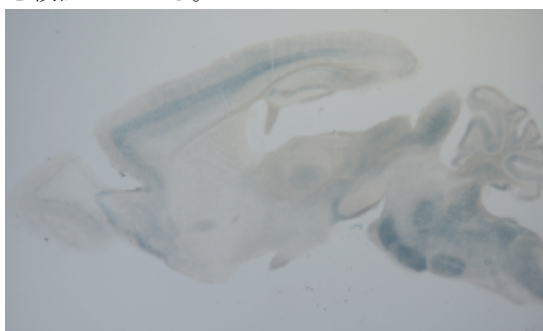


図 2. S100b-iCre マウス成体脳矢状断切片。Cre 活性 (青色) が海馬 CA2 領域に認められる。

Cre 活性依存のかつ Tc 誘導型 DTR-Venus 融合タンパク発現マウスを樹立し、Cre 活性依存的にマウス脳内で DTR-Venus が発現することを確認できた (図 3)。TeNT 発現マウスについては理研バイオリソースに登録されている Tc 誘導型 TeNT 発現マウス系統 (RBRC02958) を入手した。現在、両系統とも各種の iCre-または tTA-KI マウスと交配し、CA2 領域選択的シナプス伝達遮断または神経細胞除去マウスを作製している。

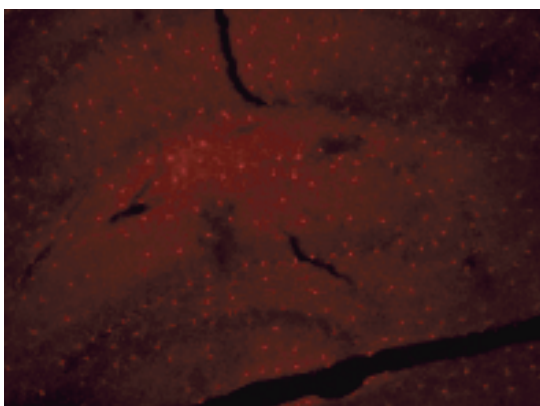


図 3. Cre 活性依存のかつ Tc 誘導型 DTR-Venus 発現マウスの成体海馬の抗 Venus 抗体による免疫染色像 (赤色)。Aif-iCre マウスとの交配により、ミクログリア選択的な Cre 活性に依存して DTR-Venus 融合タンパク質が発現していることが示唆される。

(2) Cacng5-, Rgs14-iCre KI マウスについては予想よりも Cre 活性の CA2 領域選択性が

低かったため、これらの系統と GluN1-flox マウスとの交配による CA2 選択的 GluN1 KO マウス作製は保留した、しかし GluN1 は主に神経細胞で機能する分子であると考えられるため、現在は S100b-iCre マウスとの交配に切り替えて作製を行っている。

(3) ウイルスベクター等を用いてトレーサー物質を Cre 活性または Tc 誘導により CA2 に局限して発現させ、CA2 を介する回路網を可視化する予定であったが、(2) と同様の理由で、より高い発現選択性を持つドライバーマウスを作製して用いる実験の立案中である。

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)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Fujita H, Aoki H, Ajioka I, Yamazaki M, Abe M、他 3 名、Detailed expression pattern of aldolase C (Aldoc) in the cerebellum, retina and other areas of the CNS studied in Aldoc-Venus knock-in mice. *PLoS One*. 2014 Jan 27;9(1):e86679. doi: 10.1371/journal.pone.0086679. 査読有り

② Tanimura A, Uchigashima M, Yamazaki M, Uesaka N, Mikuni T, Abe M、他 4 名、Synapse type-independent degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 24;109(30):12195-200. doi: 10.1073/pnas.1204404109. 査読有り

③ Okuno H, Akashi K, Ishii Y, Yagishita-Kyo N, Suzuki K, Nonaka M, Kawashima T, Fujii H, Takemoto-Kimura S, Abe M、他 5 名、Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β . *Cell*. 2012 May 11;149(4):886-98. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.062. 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

① 阿部学、Systematic generation of conditional gene targeting mice developed using C57BL/6 ES cell line RENKA for analysis of brain functions. 北米神経科学学会 Neuroscience2012、2012 年 10 月 13 日~17 日、アメリカ、ニューオーリンズ

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/cellular/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 学 (ABE MANABU)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号：10334674

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：