

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700488

研究課題名(和文) ドミナント・ネガティブ型 Cre を応用した扁桃体特異的遺伝子 KO マウスの作成と解析

研究課題名(英文) Creation and analysis of amygdala-specific gene knockout mice utilizing a dominant-negative mutant of Cre

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、情動をつかさどる脳部位である扁桃体特異的に遺伝子が欠損するマウスを作製する事である。高度な扁桃体特異性を確立させるために、我々は DNA 組み換え酵素である PhiC310 と Cre のドミナント・ネガティブ体を利用し、Cre による遺伝子欠損領域を絞り込みに取り組んだ。

我々は Cre の Y324F 変異体の遺伝子導入マウスを作製し、その機能解析を行った。また PhiC310 が脳神経系において Cre と協調して DNA 組み換えを行う事を確認した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to develop a method to create mice in which the deletion of any gene of interest is highly restricted to the amygdala that subserves emotional functions. For this purpose, we tried to utilize site-specific DNA recombinase PhiC310 and a dominant-negative mutant of Cre to establish highly regional specificity. We determined that phiC310 was effective in mammalian central nervous system in conjunction with the Cre recombinase. And we created and analyzed the transgenic mice expressing Y324F mutant of Cre recombinase to verify its dominant-negative function.

研究分野：脳神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：Cre recombinase Amygdala dominant-negative

1. 研究開始当初の背景

特定の機能遺伝子を欠損させる、いわゆる標的遺伝子組み換え法は、個体レベルの遺伝子機能研究において不可欠な手段となっている。しかし、通常の標的組み換え法における遺伝子欠損では、全ての細胞の遺伝子が欠損してしまう。そのため、脳・神経系の機能解析を目的とした研究であっても、それ以外の遺伝子欠損の影響に起因して致死であったり極端に不健康であったりし、脳機能を行動レベルで解析するまでに至れないケースが多々ある。その場合、特定の脳部位のみで遺伝子欠損を誘導する必要がある。配列特異的DNA組み換え酵素のCreリコンビナーゼ(Cre)は、バクテリオファージP1に由来する配列特異的なDNA組み換え酵素であり、哺乳類の体内でも機能することから、部位特異的な遺伝子欠損マウス作製の為のツールとして使用されている。脳神経系の分野においては、1996年に発表された海馬CA1野特異的遺伝子欠損マウスを始め、Cre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ぎ、海馬の各領域、小脳のプルキンエ・顆粒細胞、線条体などの特異的遺伝子欠損マウスがこれまで報告されている。この方法の場合、遺伝子欠損の脳部位特異性、つまりCreの発現部位は、接続する各種遺伝子プロモーターの発現特性に依存する。しかし、興味ある脳領域に高い特異性を持った発現をするプロモーターを同定することは多くの労力を要するし、任意の脳部位・時期に都合の良い遺伝子プロモーターが必ず存在するとは限らない。

扁桃体は、ものの好き嫌いや情動に関係すると考えられてされており、近年極めて注目されている脳領域である。扁桃体に特異的な遺伝子欠損法が確立されれば、恐怖・不安などの情動における遺伝子の個体レベルによる解析が可能になる。しかし、扁桃体に特異性の高い遺伝子発現を示すプロモーターは

見つかっておらず、扁桃体特異的な遺伝子欠損マウスの作製は現状のCreを用いたシステムでは困難な状況にある。

2. 研究の目的

従来は困難であった扁桃体特異性の高いNMDA受容体欠損マウスを作製し、扁桃体におけるシナプス可塑性の生理的意義を個体において明らかにすることを研究期間内の目的とする。またその目的のために、ドミナント・ネガティブ型のCreリコンビナーゼを確立し、それをCreとは別の配列特異的DNA組み換え酵素によって機能制御させる遺伝子発現系を確立させる。

3. 研究の方法

Creの機能発現における扁桃体特異性を向上させるために、野生型Cre活性を抑制するドミナント・ネガティブ型のCre(dnCre)をデザインし、任意の脳領域で効率よくCreのリコンビナーゼ機能を阻害する分子を作製する。それによりCreの機能領域を狭め、高い脳部位特異性を確立させる。Creは、アミノ酸における324番目のチロシン残基がDNAの1端と結合することによりDNAの組み換えを触媒する。このチロシン残基を他のアミノ酸に置換させたミュータント分子は、組み換え能力が消失することが示されている。特にチロシンをフェニルアラニンに置換(Y324F)させた場合、DNAに結合するOH基のみが消失しその他の構造はほぼ同一であるので、DNAに結合するだけで組み換えを触媒せず、野生型Creの組み換え活性を邪魔するdnCreの最も強い候補である。そこで、CAG promoterにより恒常的に発現されるdnCre発現制御を、PhiC310の様なCreとは別の配列特異的DNA組み換え酵素によって脳部位特異的に発現制御させたマウスを作製し、Cre, floxマウスと交配させる。これにより、野生型Creの機能する領域が更に限定される事によって、

遺伝子欠損の部位特異性を高める事を目指す。

4. 研究成果

ほぼ全身の細胞で強い発現能力があることが知られている CAG プロモーターの下で CreY324F 変異体分子を発現する遺伝子導入マウス(CYG, 図 1C)を作製した。結果的に遺伝子導入マウスは3つのサブラインが得られた。それらのラインにおいて定量PCRによる Y324F 変異分子の発現解析を行い、特に発現量が高いと思われるサブラインを選択した。その遺伝子導入マウスと、CamKII プロモーター下で野生型 Cre を発現するマウス (CamKII-Cre, 図 1A)と交配し、マウス脳内における CreY324F 変異体分子における野生型 Cre の機能抑制能を検証した。検証の際には、CAG プロモーター下にて Cre-loxP 反応依存的に LacZ を発現する遺伝子導入マウス(CAG-Z, 図 1B)を用いる。Cre による DNA 組み換えにより CAT 遺伝子が欠失すると、その代わりに LacZ 遺伝子が発現する。CamKII プロモーターは脳内、特に前脳内において比較的広領域に機能する為、CamKII-Cre と CAG-Z の量遺伝子を持つマウスでは前脳内で広く LacZ が発現し、染色により青く染まる。我々は交配により更に CYG 遺伝子が導入されたマウスを作製した。CreY324F 変異体がドミナント・ネガティブ能を有するのであれば、組み換えは阻害され、マウスの脳は青く染まらない事が期待される。しかし、染色状況に大きな差は無かった。この結果は、残念ながら、CreY324F 変異体分子は大きなドミナント・ネガティブ能が無い事を示す。現在、強いドミナント・ネガティブ能を有する分子を広く探索する手段を検討中である。

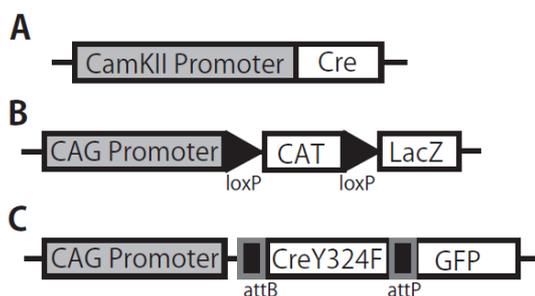


図 1

研究目的の為のもう一つのブレイクスルーが、Cre と並列して用いる第二の配列特異的 DNA 組み換え酵素の真核生物内、脳・神経系内で機能することの確認である。今回我々は、この第一候補である PhiC310 が HEK 培養細胞系でも機能することを確認した。また、Cre 依存的に PhiC310 が発現するベクターを用いる事により、Cre 依存的に PhiC310 特異的な遺伝子組み換えが誘導されることを確認した。

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3件)

(1) Lemur kinase 3 deficiency causes pronounced locomotor hyperactivity and impairs endocytic trafficking.

Inoue T, Hoshina N, Nakazawa T, Kiyama Y, Kobayashi S, Abe T, Yamamoto T, Manabe T and Yamamoto T J. Neurosci. , 34: p5927-5937, (2014)

(2) NMDAR2B tyrosine phosphorylation is involved in thermal nociception.

Delawary M., Tezuka T., Kiyama Y., Yokoyama K., Wada E., Wada K., Manabe T., Yamamoto T., Nakazawa T. Neurosci. Lett., 516(2) : p270-273, (2012)

(3) Age-dependent regulation of depression-like behaviors through

modulation of adrenergic receptor ^{1A}
subtype expression revealed by the
analysis of interleukin-1 receptor
antagonist knockout mice.

Wakabayashi C., Kiyama Y., Kunugi H.,
Manabe T., Iwakura Y.

Neuroscience , 192 : p475-484, (2011)

〔学会発表〕(計 1件)

細胞接着因子 Cadherin11 は正常な聴覚機能
獲得に必須である

城山優治、吉川弥生、竹市雅俊、山嵜達也、
真鍋俊也

第35回日本分子生物学会退会
2012年12月11日～12月14日
マリンメッセ福岡(福岡市)

〔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.ims.u-tokyo.ac.jp/NeuronalNetwork/Neuronal_Network/publications.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