

新しい発生工学技術の開発による研究基盤高度化に関する研究

主任研究者 笹岡 俊邦 国立精神・神経センター神経研究所 室長

マウス個体において細胞特異的に目的遺伝子にアミノ酸置換などの変異を導入する方法の開発とそれに基づく遺伝子機能の解明を目的として研究を進め、基本的には新技術の開発に成功した。神経機能分子を対象として変異導入を行い、神経細胞機能異常に関する知見を得た。さらに多局面での解析を行うため、新たなマウス作成も継続中である。

分担研究者

鍋島陽一 京都大学大学院医学研究科 教授

A. 研究目的

ヒトゲノムプロジェクトの推進や遺伝性疾患の原因遺伝子の探究により、遺伝子の構造解析が飛躍的に進展し、疾患と遺伝子変異、遺伝的背景の関連が明らかにされつつある。この成果を遺伝子機能の解明、病態解析に発展させるためには、動物個体を解析の場とする実験系の開発、高度化が不可欠である。多くの遺伝子疾患では単なる遺伝子欠失ではなく、特定のアミノ酸の変異や特定の配列の欠失あるいは増幅が観察される。また多くの遺伝子はいくつかの場面で重要な機能を担っており、その真の機能解析のためには個別の場面での機能を解析する必要があり、新たな方法の開発が待たれる。われわれは、これらの問題点を解決するため、マウス発生工学技術を用いて「目的とする組織や発生段階で、対象遺伝子にアミノ酸の変異や、部分欠損、部分増幅を導入する方法」の開発を進めている。

B. 研究方法

チャンネルなどの神経機能分子は特定のアミノ酸を置換することにより機能の質的变化をもたらされる。このようなアミノ酸変異をマウス個体の特定細胞で再現できる新たな発生工学システムを開発し、シナプス形成とその可塑性、神経細胞興奮性、神経細胞障害毒性、神経疾患の病態解析に応用することを目標として以下の実験を行った。

中枢神経系で発現するNMDA型グルタミン酸受容体を対象として、Ca²⁺イオンの透過性に関わるアミノ酸置換が誘導可能な遺伝子改変マウスの作成を行った。正常配列を持つエクソンの両側にloxP配列を配置し、その下流にアミノ酸変異を導入したエクソンを配置した相同組み換えベクターを作成し、マウス胚性幹(ES)細胞に導入する。この状態では2つのエクソンの間のイントロン配列を工夫することにより、絶えず正常配列を持つエクソンのみを選択させることが可能であるが、正常配列エクソンを欠失させると変異配列を持つエクソンが利用され、

転写産物に変異が導入される。このようにNMDA受容体遺伝子を改変したES細胞由来のマウス個体を作成する。作成したマウス個体の特定細胞で正常配列を持つエクソンを欠失させる方法として、Creレコンビネース-loxPシステムを利用する。

上記の目的のために特定の部位でCreレコンビネースを発現させる必要があり、神経細胞特異的にCreレコンビネースを発現するトランスジェニックマウスとNMDA受容体遺伝子改変マウスと掛け合わせてNMDA受容体へのアミノ酸置換を誘導させる実験を行った。得られたマウスにおいてNMDA受容体の機能変化が導入されたことを電気生理学的に解析するため、脳スライスパッチクランプ実験の準備を始めた。

C. 研究結果

(1) アミノ酸の変異や、部分欠損、部分増幅を導入する方法の開発

上記の方法により作成したNMDA受容体遺伝子改変マウスはホモ接合体であっても野生型と変わらないが、神経細胞に広くCREレコンビネースを発現するマウスと掛け合わせて、CRE-loxPによる変異導入を広い範囲で行ったところ、生後2週ごろより運動障害、成長不良を示し多くは致死であった。このマウスの表現型はNMDA受容体にCa²⁺イオンの透過性に関わるアミノ酸置換が導入され、神経細胞興奮性、神経細胞死などの異常が起こされたものと考えられる。NMDA受容体へのアミノ酸置換導入について生化学的に解析するとともに、NMDA受容体機能の電気生理学的解析を進めている。

(2) 神経細胞特異的にCREレコンビネースを発現するマウスの作製

神経細胞特異的にアミノ酸置換を導入する目的で、特定の神経細胞群の一つとして、ドーパミン神経細胞を対象とし、遺伝子機能の質的变化を導入してパーキンソン病に類似する運動異常を示すマウスの作成を目標としている。既にドーパミン神経特異的に遺伝子を発現するプロモーターを用いて、ドーパミン神経特異的にCREが発現するTgマウスを作成した。現在、これらのTgマウスをマーカー遺伝子の発現によりCREの作用する細胞を見

分けるためのマウスと掛け合わせて、作製されたTgマウスのCREリコンビネースの発現様式を解析中である。また、小脳特異的にCREリコンビネースを発現するマウスの準備も進めている。

D. 考察

上記のように新しい発生工学システムを開発し、目的の細胞でNMDA受容体遺伝子にCaイオンの透過性に関わるアミノ酸置換を導入することに成功した。得られたマウスでは、アミノ酸置換によると考えられる神経系の異常を示しており、NMDA受容体分子の機能変化がマウス個体の表現型の変化に至る機構を詳細に解析してゆくことが可能である。今後、NMDA受容体へのアミノ酸置換導入について生化学的解析をするとともに、NMDA受容体機能の電気生理学的解析を進める予定である。また、新たな遺伝子改変マウスも作成して、このたび開発したシステムを安定した方法として確立し、広く応用可能であるかを検証してゆきたい。

E. 結論

マウス個体において細胞特異的に目的遺伝子にアミノ酸置換などの変異を導入する方法の開発とそれに基づく遺伝子機能の解明を目的として研究を進め、NMDA受容体遺伝子を対象として新技術の開発に成功し、神経系の機能異常を示すマウスを作成することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Sasaoka T., et al. γ -Sarcoglycan-deficient mice exhibited degeneration, regeneration and fibrosis in skeletal muscles and motor weakness earlier in life than *mdx* mice.

(manuscript in preparation)

2. 学会発表

(1) Sasaoka T. et al. Muscular dystrophic phenotype in the gamma-sarcoglycan-deficient mice. American Society of Human Genetics 48th Annual Meeting 平成10年10月27-31日 米国コロラド州 デンバー

(2) 笹岡俊邦 他 「 γ -サルコグリカン欠損マウスにみられた筋ジストロフィー様の所見」 第21回 日本分子生物学会年会 平成10年12月19日 パシフィコ横浜

G. 知的所有権の取得状況 なし

NMDA受容体遺伝子への点突然変異導入

分担研究者 鍋島陽一（京都大学大学院医学研究科教授）

研究要旨 新しい発生工学技術の開発を目的として、組織、細胞特異的に点突然変異を導入する方法の開発を試みた。対象としてNMDA受容体のMgブロックに関連する配列に変異をいれることを計画し、その領域を含む遺伝子より相同組み換えベクターを構築し、ES細胞に導入し、相同組み換え細胞を分離し、Cre-recombinaseの作用によりNeo-TKカセットを切り取るとともに、2個のloxP配列が残った細胞を選択した。この細胞よりキメラマウスを作成し、ついで組み換え遺伝子が受け継がれた個体を分離し、目的の相同組み換えマウスの作成に成功した。

A. 研究目的

医学研究の進歩により疾患の理解と治療法の開発のためには関連する遺伝子の分離とその機能を改変したモデル動物が開発が不可欠であることが示されている。同時にこれまでの方法では詳細な解析が困難なことが多く、よりヒト疾患に類似のモデル動物の作製と詳細な解析のための新たな技術開発がもたられていた。今回、その試みの一つとして特定の細胞でターゲット遺伝子に変異を導入する方法の開発を試みた。

B. 研究方法

特定の細胞でターゲット遺伝子に変異を導入する方法の開発のためのパイロット実験として、NMDA受容体チャンネルのe1サブユニットのMgブロックに関与するアミノ酸に変異を導入し、Mgブロックを解除することを試みた。Mgブロックに関与するe1サブユニットの膜貫通ドメイン2のアルギニンをグルタミンに変換するために、e1サブユニットの膜貫通ドメイン2を含む正常配列のエクソンとアミノ酸置換のための変異を導入した相同のエクソンを構築し、タンデムに並べた。この正常、および変異型エクソンの間に人工のイントロンを挿入したターゲティングベクターを構築し、相同組み換えマウスを作製した。なお、人工イントロン配列と、正常エクソンの上流にloxP配列をもつように構築しており、Cre-recombinaseの作用により正常エクソンを欠失させて時のみ変異型エクソンが読み取られるようにした。

C. 研究結果

Neo-Dtの活性を指標に候補細胞を選択し、ついで、DNAを分離し、PCRにより相同組み換え細胞を同定した。おおよそ1%の細胞が相同組換え細胞であった。これらの細胞にCre-recombinase発現ベクターを導入し、Neo-TK遺伝子のみが切り取られた細胞を選択した。大部分の細胞はさらに広い範

囲の遺伝子を切り取ったパターンで、目的のパターンに切り取られた細胞は30個に1個程度しか分離できなかったことから、このステップの効率の向上が次の課題として残った。最終的に選択された細胞を用いてキメラマウスを作成し、Germlineに遺伝子が伝えられた個体を選択し、掛け合わせによりホモ変異マウスを作成した。得られた相同組み換えマウスはホモでもまったく行動異常などの神経系の機能異常を示す所見は観察されず、野性型と区別がつかない。しかし、神経細胞でCre-recombinaseを発現するマウス系統と掛け合わせたヘテロマウスはspasticとなり、カルシウムイオンの透過性の上昇を推定させる行動を示した。この行動異常は変異が導入されたことによりドミナントの効果が現われたためと推定された。次いで、ホモに変異が導入されたマウスを作製したところ、生後数日以内に多くのマウスが食殺されたが、この結果はホモマウスにおいて発育異常、機能異常が顕著であることを類推させるものである。

D. 考察

Cre-recombinase発現ベクターを導入し、Neo-TK遺伝子のみを切り取るステップの効率を向上させる手段の開発が次の課題として残った。

Mgブロックはシナプス刺激に伴うカルシウムの流入を制御し、長期増強の基盤をなす機構であるとともに、カルシウムイオンの流入による神経細胞死に関与すると推定されていることから、神経疾患の理解に重要であると考えられる。なお、カルシウムイオンの流入による神経細胞死については現在解析中である。

E. 結論

特定の細胞でターゲット遺伝子に変異を導入する方法の開発に成功した。

F. 研究発表

1) Yoshida N, Yoshida S., Fujisawa-Schara A., and

Nabeshima Y. Variation of MyoD and myf-5, which precedes myogenin expression and irreversible commitment, specifies the differentiating and "Reserve Cells" upon myogenesis. *J. Cell Sci.* 111, 769-779 (1998)

2) Matsumura Y., Aizawa H., Shiraki-Iida T., Nagai R., Kuro-o M., Nabeshima Y. Identification of the human *klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted Klotho protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 242, 626-630 (1998)

3) Shiraki-Iida T., Aizawa H., Matsumura Y., Sekine S., Iida A., Anazawa H., Nagai R., Kuro-o M., Nabeshima Y. Structure of the mouse *Klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Letters* 424, 6-10, (1998)

4) Okuda A., Fukushima A., Nishimoto M., Orimo A., Yamagishi T., Nabeshima Y., Kuro-o M., Nabeshima Y., Boon K., Keaveney M., Stunnenberg H.G., Muramatsu M. UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *EMBO J.* 17, 2019-2032 (1998)

5) Kurisaki T., Masuda A., Yagami-Hiromasa T., Nabeshima Y. and Fujisawa-Sehara A. Spatially and temporally-restricted expression of *meltrin a* and *b* in mouse embryo. *Mechan. Dev.* 73, 211-221 (1998)

6) Takahashi S., Esumi E., Nabeshima Y., Asashima M. Regulation of the *Xmyf-5* and *XmyoD* expression pattern during early *Xenopus* development. *Zoolog. Sci.* 15, 231-238 (1998)

7) Saito Y., Yamagishi T., Nakamura T., Ohyama Y., Aizawa H., Suga T., Matsumura Y., Masuda H., Kurabayashi M., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R. *Klotho* protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 248, 324-329 (1998)

8) Nakagoshi H., Hoshi M., Nabeshima Y., Matsuzaki F. *defective proventriculus* encodes a novel homeodomain protein required for the functional specification in *Drosophila* midgut. *Gene & Develop.* in press

9) Aizawa H., Saito Y., Nakamura T., Inoue M., Imanari T., Ohyama Y., Matsumura Y., Masuda H., Oba S., Mise N., Kimura K., Hasegawa A., Kurabayashi M., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R. Downregulation of the *klotho* gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 249, 865-871 (1998)

10) Ohyama Y., Kurabayashi M., Masuda H., Nakamura T., Aihara Y., Kaname T., Suga T., Arai M., Aizawa H., Matsumura Y., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R.

Molecular cloning of Rat *klotho* cDNA: markedly decreased expression of *klotho* by acute inflammatory stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* in press

11) Yamashita T., Nifuji A., Furuya K., Nabeshima Y., Noda M. Elongation of the epiphyseal trabecular bone in transgenic mice carrying a *klotho* gene locus mutation that leads to a syndrome resembling aging. *J. Endocrinology* 159, 1-8 (1998)

12) Hoshi no M., Suzuki E., Miyake T., Sone M., Komatsu A., Nabeshima Y., Hama C. Neural expression of *Hikaru genki* protein during embryonic and larval development of *Drosophila melanogaster*. *Development Genes and Evolution* in press

13) Kameya S., Miyagoe-Y., Nonaka I., Ikemoto T., Endo M., Honoaka K., Nabeshima Y., Takeda S., *al-Syntrophin* gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. *J. Biol. Chem.* 274, 2193-2200 (1999)

G. 知的所有権の取得状況
なし