

199900350A

総括研究報告書概要版

総括研究報告書

分担研究報告書

平成11年度
厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

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
(課題番号 H10-ゲノム-023)

主任研究者：笹岡 俊邦
(国立精神・神経センター 神経研究所)
分担研究者：鍋島 陽一
(京都大学大学院 医学研究科)

平成 12 年 4 月 5 日

厚生大臣 丹羽 雄 哉 殿

フリガナ ササオカ トシクニ
 研究者 氏 名 笹 岡 俊 邦
 (所属施設 国立精神・神経センター)

平成 11 年度厚生科学研究費補助金 (ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業) に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 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 (H10-ゲノム-023)

国庫補助金精算所要額 : 金 50,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総合研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添 1 のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添 2 のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添 3 のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、 巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
(笹岡俊邦) <i>Hum Molec Genet</i> vol 8 Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice.	1999	Oxford Univ. Press	Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E, Yoshida M, Hori T and Ozawa E
<i>J. Neurosci.</i> vol 19 Catecholamine synthesis is mediated by tyrosinase in the absence of tyrosine hydroxylase.	1999	Society for Neuroscience	Rios, M., Habecker, B., Sasaoka, T., Eisenhofer, G., Tian, H., Landis, S., Chikaraishi, D., and Roffler-Tarlov, S.
<i>Hum Molec Genet</i> vol 9 Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy	2000	Oxford Univ. Press	Yoshida M, Hama H, Ishikawa-Sakurai M, Imamura M, Mizuno Y, Araishi K, Wakabayashi-Takai E, Noguchi S, Sasaoka T and Ozawa E

(鍋島陽一) <i>J. Biol. Chem.</i> 274, 17837-17844 Identification of the <i>stef</i> gene that encodes a novel guanine nucleotide exchange factor specific for Rac1	1999	The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.	Hoshino M., Sone M., Fukata M., Kuroda S., Kaibuchi K., Nabesima Y., Hama C.
<i>J. Biol. Chem.</i> 274, 2193-2200 α 1-Syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration	1999	The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.	Kameya S., Miyagoe-Y., Nonaka I., Ikemoto T., Endo M., Honaoka K., Nabeshima Y., Takeda S.
<i>J. Biol. Chem.</i> 274, 38211-38215 Growth Retardation in mice lacking the proteasome activator PA28 γ	1999	The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.	Murata S., Kawahara H., Tohma S., Yamamoto K., Kasahara M., Nabeshima Y., Tanaka K., Chiba T.
<i>Muscle & Nerve</i> 22, 592-599 Effective adenovirus-mediated gene expression in adult murine skeletal muscle.	1999	John Wiley & Sons, Inc	Ishii A., Hagiwara Y., Saito Y., Yamamoto K., Yuasa K., Sato Y., Arahata K., Shoji S., Nonaka I., Saito I., Nabeshima Y., Takeda S.
<i>Biochem. Biophys. Res. Comm.</i> 266, 216-221 Identification of EPS8 as a Dvl1-Associated Molecule.	1999	Academic Press	Inobe M., Katsube K., Miyagoe Y., Nabeshima Y., Takeda S.
<i>Endocrinology</i> 141, 1, 438-445 Retardation in Bone Resorption after Bone Marrow Ablation in <i>Klotho</i> Mutant Mice.	2000	The Endocrine Society	Yamashita T., Yoshitake H., Tsuji K., Kawaguchi N., Nabeshima Y., Noda M.
<i>Biochem. Biophys. Res. Comm.</i> 267, 597-602 Establishment of the Anti-Klotho Monoclonal Antibodies and Detection of Klotho Protein in Kidneys.	2000	Academic Press	Kato Y., Arakawa E., Kinoshita S., Shirai A., Furuya A., Yamano K., Nakamura K., Iida A., Anazawa H., Koh N., Iwano A., Imura A., Fujimori T., Kuro-o M., Hanai N., Takeshige K., Nabeshima Y.

4. 研究成果による特許権などの知的財産権の所得状況

研究費の名称=厚生科学研究費補助金

研究事業名=ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

研究課題名=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（総括研究報告書）

国庫補助金精算所要額（円）=50,000,000

研究期間（西暦）=1997-1999

研究年度（西暦）=1999

主任研究者名=笹岡 俊邦（国立精神・神経センター 神経研究所）

分担研究者名=鍋島 陽一（京都大学大学院医学研究科）

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求により、遺伝子の特定のアミノ酸配列が病態の理解に重要であることが明らかになってきた。また多くの遺伝子は複数の場面で重要な機能をもっており、特定アミノ酸配列の変異と遺伝子機能の関連及び疾患の成り立ちの解明を進めるには、動物個体の個別の場面で、対象分子のアミノ酸置換を導入できる新たな発生工学技術の開発が必要である。我々はこれらの問題点を解決するため「目的とする組織や発生段階で、対象分子にアミノ酸の変異・部分欠損・部分増幅を導入する新たなシステム」の開発をおこなっており、現在の発生工学技術をさらに一歩進めて、「疾患の理解、遺伝子の機能の理解に最もふさわしいモデル動物を作成する技術を開発」し、研究基盤の高度化に貢献することを目指している。

研究方法= 我々は、NMDA 受容体の Ca イオン透過性を調節するアミノ酸の置換を、特定細胞において導入することを目的として、これまでに新たな実験システムを開発し、アミノ酸置換マウス作成に成功した。本年度は、アミノ酸置換導入様式の解析、NMDA 受容体機能の電気生理学的解析、ならびに特定時期に誘導的に変異を導入するシステムの開発、精神・神経疾患関連分子のアミノ酸置換マウス作成への応用をおこなった。

(1) 特定アミノ酸の変異・部分欠損・部分増幅を導入する方法の開発： NMDA 受容体 epsilon1 サブユニット遺伝子の Ca イオン透過性に関わるアミノ酸をコードする正常配列エクソンと変異配列エクソンを並列に配置し、正常エクソンの両側に loxP 配列を導入し、2つのエクソン間のイントロンを人工的に改変した相同組換えベクターを構築し、マウス胚幹 (ES) 細胞を用いた相同組換えにより、ベクターを組み込んだマウス個体 (NMDA/loxP マウス) を作成した。この状態では、絶えず正常配列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エクソンが利用され、転写産物に変異が導入される。正常配列エクソンを欠失させる方法として Cre-loxP システムを利用する。

(2) 特定細胞におけるアミノ酸置換の導入： Nestin プロモーターの発現調節により神経細胞で Cre を発現するトランスジェニックマウス (Cre マウス) と NMDA/loxP マウスを掛け合わせ、NMDA/loxP-Cre マウスを得て、神経細胞特異的に NMDA 受容体のアミノ酸置換を導入した。また、小脳特異的あるいは、ドーパミン神経特異的にアミノ酸置換を誘導するため、小脳特異的あるいは、ドーパミン神経特異的に Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスを用意している。

(3) 電気生理実験による NMDA 受容体の機能解析： 真鍋俊也教授（神戸大学医学部）の指導を得て、スライスパッチクランプ法及び細胞外電位記録法を用いて海馬 CA1 領域の錐体細胞における NMDA 受容体機能の変化と神経可塑性を解析した。

(4) 特定時期に誘導的に変異を導入するシステムの開発： マウスの発達の目的の時期に薬物投与などにより、誘導的に Cre recombinase を発現させ、Cre-loxP による変異の導入をおこなうため、タモキシフェンをリガンドとするタモキシフェン受容体のシステムを用いてトランスジェニックマウスを作成し、特定時期における変異誘導系を作成している。

(5) 精神疾患・神経疾患の病態モデルマウス作成への応用： 我々の開発した新しいアミノ酸置換法を GABA

受容体とドーパミン受容体に応用し、分子の機能ドメインにアミノ酸置換を導入する変異マウスの作成をすすめている。

(倫理面への配慮)本研究のすべての動物実験はマウス個体を対象とし実験実施場所が定める「動物実験に関する倫理指針」にもとづき行われた。

結果と考察= (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： RNA スプライシングの機構と Cre recombinase-loxP 組換えシステムを応用して、我々独自のアミノ酸配列変換のシステムを開発した。本方法により作成した NMDA 受容体 epsilon1 サブユニット改変 (NMDA/loxP) マウスは Cre の作用する前は、ホモ接合体であっても、成長・繁殖は野生型と変わらず、運動異常などを示さなかった。NMDA/loxP マウス脳の mRNA を調べたところ、NMDA 受容体 epsilon1 サブユニットの正常配列エクソンが発現していた。Nestin プロモーターにより神経細胞に Cre recombinase が発現するトランスジェニックマウス (Cre マウス) と掛け合わせ、NMDA/loxP-Cre マウスを作成し、マウスの各臓器における変異導入の様式をサザンプロット、PCR 法により調べたところ、脳及び脊髄で組換えが起こっていた。脳の各部位での組換えを調べると効率の差はあるが、神経細胞で広く組換えが起こっていることが明らかとなった。さらに、NMDA 受容体 epsilon1 遺伝子 mRNA を調べたところ、変異配列が利用されており、アミノ酸置換が示唆された。この NMDA/loxP-Cre マウスは、ほぼ全例が生後 2 週頃から発育不全と運動機能異常を示し、NMDA 受容体に Ca イオン透過性を上昇させるアミノ酸置換による神経細胞活動性異常が示唆された。NMDA/loxP-Cre マウスの脳の光顕レベルでの形態学的観察では、明らかな構造変化は見られなかった。また、小脳特異的に Cre recombinase を発現するマウス、ドーパミン神経特異的に Cre recombinase を発現するマウスを用意しており、それぞれ NMDA/loxP マウスとの掛け合わせにより特定細胞でのアミノ酸置換を行い、特定場面での機能変化を解析する。

(2) 電気生理実験による NMDA 受容体の機能解析： マウス脳スライスパッチクランプ実験により、海馬 CA1 領域の錐体細胞の NMDA 受容体の機能を解析したところ、NMDA 受容体の機能の中核である、Mg ブロックによる Ca イオン透過性の調節機構が変換されていた。また細胞外電位記録法による実験では、神経可塑性の指標として解析される長期増強現象 (LTP) においても変化が見られた。本システムによる変異導入が成功していることが示された。我々の NMDA/lox-Cre マウスによって、個体における解析が可能となった。NMDA 受容体機能の中核である Mg ブロックの解除による Ca イオンの過剰な流入は、神経細胞死の初期過程の機構と考えられており、病態の理解に有用である。また、LTP 現象の機構を理解するうえでも、NMDA 受容体のアミノ酸置換による Mg ブロック機能の解除と Ca イオンの流入による効果を解析することは重要な知見をもたらす。

(3) 精神疾患・神経疾患の病態モデルマウス作成への応用： 「てんかん」の病態を理解すること及び治療法開発に有用な基礎データを得ることにふさわしいモデルマウスを作成するため、我々の開発した新しいシステムを GABA 受容体に応用し、機能変換を導入するマウスを作成している。

「パーキンソン病」のモデルマウスを作成する目的で、中脳黒質ドーパミン神経特異的に変異を導入できるマウスを作成する。Cre recombinase を発現させるため、チロシン水酸化酵素遺伝子プロモーターを用いて Cre recombinase 発現ベクターを構築し、6 系統のトランスジェニックマウスを作成した。次いでこのマウスと Cre recombinase の機能をアッセイするレポーターマウスの掛け合わせをおこない、Cre recombinase の発現細胞の同定をおこなっている。あわせて、我々のシステムを用いて黒質-線条体神経回路の神経伝達の機能分子である、ドーパミン受容体の機能変換マウスの作成をおこなっている。

(4) 今後の展望： これまでに完成させた新しい発生工学システムは、対象分子の特定のアミノ酸置換を特定場面で導入することに有用である。さらに今後は、ヒト疾患の原因遺伝子の解析で明らかになってきた、一つの遺伝子座に見られる多数の変異を効率的にマウス個体に導入し、遺伝子の変異と表現型の関連を解析することのできる発生工学システムの開発へ発展させてゆきたい。

結論= 個体を実験の場とした遺伝子機能解析方法として、並びに疾患モデルマウスの作成法としてマウス発生工学技術は、近年急速に発展した。本研究では、現在の発生工学技術の問題点にブレイクスルーをはかるため、マウス個体の「目的とする組織や発生段階で、対象分子にアミノ酸の変異・部分欠損・部分増幅を導入する新たなシステム」を開発した。本システムを用いて目的の細胞で NMDA 受容体の特定機能を変えるアミノ酸置換を導入したマウスが得られ、対象分子の機能変化をマウス個体で詳細に解析することが可能となった。さらに、このシステムは精神疾患および神経疾患の病態理解にふさわしい新たなモデルマウスの作成に応用可能で、研究基盤の高度化に貢献できるものである。

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

（主任又は分担）研究者 笹岡 俊邦 国立精神・神経センター 神経研究所 室長

研究要旨 個体を実験の場とした遺伝子機能解析法として、並びに疾患モデルマウスの作成法としてマウス発生工学技術は、近年急速に発展した。本研究では現在のマウス発生工学技術の問題点にブレイクスルーをはかるため、マウス個体の「目的とする組織や発生段階で、対象分子にアミノ酸の変異・部分欠損・部分増幅を導入する新たなシステム」の開発を進め、NMDA 受容体の Ca イオン透過性を調節するアミノ酸の置換をマウス個体の特定細胞でおこなうことに成功した。本年度は、電気生理学実験による NMDA 受容体機能の変換を解析し、海馬錐体細胞で NMDA 受容体機能の変化並びに神経可塑性の変化を見いだした。本システムにより作成されたマウスを用いることにより、これまで困難であった、マウス個体の特定細胞での NMDA 受容体の特定機能の解析、神経疾患の病態機構との関連の解析が可能となった。さらにこのシステムを精神疾患および神経疾患関連の遺伝子に応用し、病態の理解にふさわしい新たなモデルマウスの作成を行い、個体を用いる研究の基盤の高度化に貢献する。

分担研究者 鍋島 陽一
京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学講座 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求により、遺伝子の構造解析が飛躍的に進展し、特定のアミノ酸配列が病態の理解に重要であることが明らかになってきた。また多くの遺伝子は複数の場面で重要な機能をもっており、特定アミノ酸配列の変異と遺伝子機能の関連及び疾患の成り立ちの解明を進めるには、動物個体の個別の場面で、対象分子のアミノ酸置換を解析できる新たなシステムの開発が必要である。我々はこれらの問題点を解決するため「目的とする組織や発生段階で、対象分子にアミノ酸の変異・部分欠損・部分増幅を導入する新たなシステム」の開発を進めてきており、本研究計画によって、現在のマウス発生工学技術をさらに一歩進めて、「疾患の理解、遺伝子の機能の理解に最もふさわしいモデル動物を作成する技術を開発」し、研究基盤の高度化に貢献することを目指している。

B. 研究方法

我々は、NMDA 受容体の Mg ブロック機能により Ca イオン透過性を調節するアミノ酸の置換を、特定細胞において導入することを目的として、これまでに新たな実験システムを開発し、アミノ酸置換マウス作成に成功した。本年度は、アミノ酸置換導入様式の解析、NMDA 受容体機能の電気生理学的解析、ならびに特定時期に誘導的に変異を導入するシステムの開発、

神経疾患関連分子の機能変換マウス作成への応用をおこなった。

(1) 特定アミノ酸の変異・部分欠損・部分増幅を導入する方法の開発

NMDA 受容体 epsilon1 サブユニット遺伝子の Mg ブロックに関わるアミノ酸をコードする正常配列エクソンと変異配列エクソンを並列に配置し、正常エクソンの両側に loxP 配列を導入し、2つのエクソン間のイントロンを人工的に改変した相同組換えベクターを構築し、マウス胚幹細胞 (ES 細胞) を用いた相同組換えにより、ベクターを組み込んだマウス個体 (NMDA/loxP マウス) を作成した。この状態では2つのエクソン間のイントロンの性質により、絶えず正常配列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エクソンが利用され、転写産物に変異が導入される。正常配列エクソンを欠失させる方法として Cre-loxP システムを利用する。

(2) 特定細胞におけるアミノ酸置換の導入

Nestin プロモーターの発現調節のもとで神経細胞で Cre を発現するトランスジェニックマウス (Cre マウス) と NMDA/loxP マウスを掛け合わせ、NMDA/loxP-Cre マウスを得ることにより、神経細胞特異的に NMDA 受容体のアミノ酸置換を導入した。

小脳特異的または、ドーパミン神経特異的にアミノ酸置換を誘導するため、小脳特異的または、ドーパミン神経特異的に Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスを用意している。

(3) 電気生理学実験による NMDA 受容体の機能解析
神戸大学医学部生理学 真鍋俊也教授の指導を得て、

主任研究者の研究室において、電気生理実験のセットアップをおこなった。マウス脳スライスパッチクランプ法及び細胞外電位記録法を用いて NMDA/loxP-Cre マウス海馬 CA1 領域の錐体細胞における NMDA 受容体機能の変化と海馬の神経可塑性を解析した。

(4) 特定時期に誘導的に変異を導入するシステムの開発 (分担研究報告書参照)

(5) 精神疾患・神経疾患の病態モデルマウス作成への応用

我々の開発した新しいアミノ酸置換法を「てんかん」および「パーキンソン病」疾患関連遺伝子に応用し、病態理解にふさわしいモデルマウス作成のため、疾患関連分子の代表である GABA 受容体とドーパミン受容体の機能ドメインにアミノ酸置換を導入する変異マウスの作成をすすめている。

(倫理面への配慮)

本研究のすべての動物実験はマウス個体を対象とし実験実施場所である国立精神・神経センター神経研究所が定める「動物実験に関する倫理指針」にもとづき行われた。

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 epsilon1 サブユニット改変 (NMDA/loxP) マウスは Cre が作用する前は、ホモ接合体であっても、成長・繁殖は野生型と変わらず、運動異常などを示さなかった。NMDA/loxP マウス脳 mRNA を調べたところ、NMDA 受容体 epsilon1 サブユニットの正常配列エクソンが発現していた。

Nestin プロモーターにより神経細胞に Cre recombinase が発現するトランスジェニックマウス (Cre マウス) と掛け合わせ、NMDA/loxP-Cre マウスを作成し、マウスの各臓器における変異導入の様式をサザンブロット、PCR 法により調べたところ、脳及び脊髄で組換えが起こっていた。脳の各部位での組換えを調べると効率の差はあるが、広く組換えが起っていることが明らかとなった。さらに、NMDA 受容体 epsilon1 遺伝子 mRNA を調べたところ、変異配列エクソンが利用されアミノ酸変異導入が行われていることがわかった。この NMDA/loxP-Cre マウスは、ほぼ全例が生後2週頃から発育不全と運動機能異常を示し、NMDA 受容体に Ca イオン透過性を上昇させるアミノ酸置換の導入による神経細胞活動性異常が示唆された。NMDA/loxP-Cre マウスの脳の光顕レベルでの形態学的観察では、明らかな構造変化は見られなかった。

(2) 電気生理実験による NMDA 受容体の機能解析

マウス脳スライスパッチクランプ実験により、海馬

CA1 領域の錐体細胞の NMDA 受容体の機能を解析したところ、NMDA 受容体の機能の中核である、Mg ブロックによる Ca イオン透過性の調節機構が変換されていた。また細胞外電位記録法による実験では、神経可塑性の指標として解析される長期増強現象 (LTP) においても変化が見られた。本システムによる変異導入が成功していることが示された。

(3) 精神疾患・神経疾患の病態モデルマウス作成への応用

「てんかん」の病態を理解すること及び治療法開発に有用な基礎データを得ることにふさわしいモデルマウスを作成するため、我々の開発した新しいシステムを GABA 受容体に応用し、アミノ酸置換により機能変換を導入するマウスを作成している。

「パーキンソン病」のモデルマウスを作成する目的で、中脳黒質ドーパミン神経特異的に Cre recombinase を発現させ、変異を導入できるマウスを作成する、ドーパミン神経に発現させるため、チロシン水酸化酵素遺伝子プロモーターを用いて Cre recombinase 発現ベクターを構築し、6 系統のトランスジェニックマウスを作成した。次いでこのマウスと Cre recombinase の機能をアッセイするレポーターマウスの掛け合わせをおこない、Cre recombinase の発現細胞の同定をおこなっている。

あわせて、我々の開発したシステムを用いて黒質-線条体神経回路の神経伝達の機能分子である、ドーパミン受容体のアミノ酸置換マウスの作成をおこなっている。

D. 考察

(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

RNA スプライシングの機構と Cre recombinase-loxP 組換えシステムを応用して、我々独自のアミノ酸配列変換のシステムを開発した。NMDA 受容体 epsilon1 サブユニット遺伝子の Mg ブロックによる Ca イオン透過性を変化させるアミノ酸置換を対象として、マウスの作成をおこなった。Cre を発現するトランスジェニックマウスと掛け合わせ Cre recombinase の作用によって NMDA 受容体へのアミノ酸置換が、計画通りに導入されており、我々のシステムが成功していることが明らかとなった。

これまで、Nestin プロモーターにより神経細胞に Cre recombinase が発現するトランスジェニックマウスを用いて、神経細胞に広く変異導入をおこなった。すでに、小脳特異的に Cre recombinase を発現するマウス、ドーパミン神経特異的に Cre recombinase を発現するマウスを用意しており、それぞれ NMDA/loxP マウスとの掛け合わせにより特定細胞でのアミノ酸置換を行い、特定場面での機能変化を解析してゆく。

(2) 電気生理実験によるNMDA受容体の機能解析

これまでに我々が作成したNMDA/loxP-Creマウスの脳スライスを用いた電気生理学的解析により、計画通りにNMDA受容体のMgブロックによるCaイオン透過性調節機能が変換されていることが明らかになった。従来、Mgブロック機能は培養細胞レベルで解析されてきたが、われわれのNMDA/lox-Creマウスによって、個体において詳しい解析が可能となった。特にNMDA受容体機能の中核であるMgブロックの解除によるNMDA受容体活性化とCaイオンの過剰な流入は、神経細胞死の初期過程に関連すると考えられており、病態の理解に有用である。また、テタヌス刺激により起こされるLTP現象の機構を理解するうえでも、NMDA受容体のアミノ酸置換によるMgブロック機能の解除とCaイオンの流入上昇の効果を解析することは重要な知見をもたらす。

(3) 神経疾患の病態モデルマウス作成への応用

我々の開発した新しいシステムにより、疾患関連分子の特定局面での機能を理解でき、治療法開発のための基礎的知見を与えるモデルマウスを作成する。

「てんかん」並びに「パーキンソン病」病態モデルマウス作成のため、それぞれ、GABA受容体、ドーパミン受容体にアミノ酸置換を導入し、情報伝達の様式を変えたマウスの作成をすすめている。

(5) 今後の展望

これまでに完成させた新しい発生工学システムは、対象分子の特定のアミノ酸置換を特定場面で導入することに有用である。さらに今後は、ヒト疾患の原因遺伝子の解析で明らかになってきた、一つの遺伝子座に見られる多数の変異を効率的にマウス個体に導入し、遺伝子の変異と表現型の関連を解析することのできる発生工学システムの開発へ発展させてゆきたい。

E. 結論

個体を実験の場とした遺伝子機能解析方法として、並びに疾患モデルマウスの作成法として遺伝子ノックアウトマウスに代表されるマウス発生工学技術は、近年急速に発展した。本研究では、従来のマウス発生工学技術の問題点にブレイクスルーをはかるため、マウス個体の「目的とする組織や発生段階で、対象分子にアミノ酸の変異・部分欠損・部分増幅を導入する新たなシステム」を完成させた。本システムを用いて目的の細胞でNMDA受容体の特定機能を変えるアミノ酸置換を導入したマウスが得られ、対象分子の機能変化をマウス個体で詳細に解析することが可能となった。さらに、このシステムは精神疾患および神経疾患の病態理解にふさわしい新たなモデルマウスの作成に応用可能で、研究基盤の高度化に貢献できるものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Rios, M., Habecker, B., Sasaoka, T., Eisenhofer, G., Tian, H., Landis, S., Chikaraishi, D., and Roffler-Tarlov, S:

Catecholamine synthesis is mediated by tyrosinase in the absence of tyrosine hydroxylase. *J. Neurosci.*, 19, 3519-3526 (1999).

(2) Araishi, K., Sasaoka, T., Imamura, M., Noguchi, S., Hama, H., Wakabayashi, E., Yoshida, M., Hori, T., and Ozawa, E.

Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice.

Human Mol. Genet. 8, 1589-1598 (1999)

(3) Yoshida, M., Hama, H., Ishikawa-Sakurai, M., Imamura, M., Mizuno, Y., Araishi, K., Wakabayashi-Takai, E., Noguchi, S., Sasaoka, T. and Ozawa E.

Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Human Mol. Genet.*, (In press)

(4) Sasaoka, T., Imamura, M., Araishi, K., Noguchi, S., Mizuno, Y., Takagoshi, N., Hama, H., Wakabayashi-Takai, E., Yoshimoto-Matsuda, Y., Nonaka, I., Yoshida, M., and Ozawa, E.

Muscle degeneration and hypertrophy in muscular dystrophy; Pathologic analysis in gamma-sarcoglycan deficient mice. (Submitted)

(5) Wang, Y., Xu, R., Sasaoka, T., Sankoorikal, E.B., Toneyawa, S., and Jin, F.

Dopamine D2/Long receptor-deficient mice display hypolocomotion and reduced level of haloperidol-induced catalepsy. (In preparation)

2. 学会発表

(国内)

(1) 笹岡俊邦, 水野裕司, 野口 悟, 今村道博, 濱 裕, 新石健二, 若林恵理子, 埜中征哉, 吉田幹晴, 小沢えい二郎:

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の所見

第22回 日本神経科学大会, 大阪, 7月6-8日, 1999年

(2) 笹岡俊邦, 今村道博, 水野裕司, 濱 裕, 野口 悟, 新石健二, 若林恵理子, 埜中征哉, 吉田幹晴, 小沢えい二郎:

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の所見

第72回 日本生化学会大会, パシフィコ横浜, 10月6-9日, 1999年

(3) 新石健二, 笹岡俊邦, 今村道博, 野口 悟, 濱 裕, 若林恵理子, 吉田幹晴, 堀 哲郎, 小沢えい二郎:

β -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の所見

第72回 日本生化学会大会, パシフィコ横浜, 10月6-9日, 1999年

(4) 笹岡俊邦, 新石健二, 今村道博, 水野裕司, 濱 裕, 野口 悟, 高越奈緒美, 若林恵理子, 松田由喜子, 埜中征哉, 吉田幹晴, 堀 哲郎, 小沢えい二郎:

筋ジストロフィー・モデルマウスの樹立と解析

厚生省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーモデル及び神経・筋疾患のモデル動物の開発とその病態解明への応用に関する研究」班 平成11年度 班会議, 京都, 11月17日, 1999年

(5) 笹岡俊邦, 新石健二, 今村道博, 水野裕司, 濱 裕, 野口 悟, 高越奈緒美, 若林恵理子, 松田由喜子, 埜中征哉, 吉田幹晴, 堀 哲郎, 小沢えい二郎

筋ジストロフィー・モデルマウスの樹立と解析

2000年 生体運動合同班会議, 大阪, 1月7日, 2000年

(6) Sasaoka, T., Araishi, K., Imamura, M., Noguchi, S., Mizuno, Y., Takagoshi, N., Hama, H., Wakabayashi-Takai, E., Yoshimoto-Matsuda, Y., Nonaka, I., Yoshida, M., Hori, T. and Ozawa, E.:

Modeling muscular dystrophy in sarcoglycan deficient mice. COE Symposium 2000, Muscular Dystrophy, molecular and cellular mechanisms and gene therapy. Tokyo, March 14-16, 2000

(海外)

(1) Araishi, K., Sasaoka, T., Imamura, M., Noguchi, S., Hama, H., Wakabayashi, E., Yoshida, M., Hori, T., and Ozawa, E.: Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. American Society of Human Genetics, 49th Annual Meeting, San Francisco, California, USA, October 19-23, 1999

(2) Yoshida, M., Hama, H., Sakurai, M., Imamura, M., Mizuno, Y., Araishi, K., Sasaoka, T., Wakabayashi, E., Noguchi, S., and Ozawa, E.: Sarcoglycan-sarcospan complex interacts with syntrophins/alpha-dystrobrevin as well as the dystroglycan complex. American Society of Human Genetics, 49th Annual Meeting, San Francisco, California, USA, October 19-23, 1999

G. 知的所有権の出願・取得状況

なし

ターゲット遺伝子への点突然変異導入法の開発

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、目的の相同組み換えマウスの作成に成功した。このマウスとCre-Recombinaseを発現するマウスを掛け合わせることによって目的の点突然変異を導入することに成功した。さらに任意に時期から変異を導入するシステムを確立するためにCre-Recombinaseとタモキシフェン受容体のリガンド結合ドメインからなるキメラ蛋白発現マウスを作成し、誘導的に点突然変異を挿入するシステムを構築している。

A. 研究目的

ゲノムプロジェクトの進歩により疾患の理解と治療法の開発に関連する遺伝子の分離、およびその変異を同定する研究が急速に進みつつあり、次の課題として、遺伝子機能を改変したモデル動物を開発し、個体レベルの解析をすることが不可欠であることが示されている。これまでの方法によって遺伝子の機能欠損の解析は可能となっているが、アミノ酸の変異がもたらす異常の解析など、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構造と機能の関連を詳細に解析するための新たな技術開発がもたれられていた。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を開発し、さらに変異の導入を誘導するシステムの開発を試みた。

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epsilon 1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epsilon 1サブユニットの膜貫通ドメイン2のアスパラギンをグルタミンに変換するために、epsilon 1サブユニットの膜貫通ドメイン2を含む正常配列をもつ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あり、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。

次のアミノ酸変異を誘導的に起こさせるためにCre-recombinaseとタモキシフェン受容体のリガンド結合ドメインとのキメラ蛋白を発現するベクターを構築し、マウス受精卵に打ち込み、マウス個体を作成した。ついで、このマウスとCre-recombinaseの機能をアッセイするレポーターマウスと掛け合わせ、タモキシフェンの投与により、誘導的にCre-recombinaseが機能するTgマウス系統を分離し、誘導的にアミノ酸変異を導入システムを完成する。

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%の細胞が相同組かえ細胞であった。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の細胞で、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。

正常型から変異型への変換が正確に起こっていることを示すために相同組み換えマウス、及び、Cre-recombinaseを発現するマウスと掛け合わせを行ったマウスより mRNA を調整し、PCR 法により解析したところ、相同組み換えマウスでは変異型を発現しておらず、Cre-recombinase の発現により NMDA epsilon 1 受容体 mRNA に変異が導入されていることを確認した。

次に任意の時期に変異を誘導するためのシステムを開発する目的で、Cre-recombinase とタモキシフェン受容体のリガンド結合ドメインとのキメラ蛋白を発現するベクターを構築した。このベクターの機能を確認する目的で、Cre-recombinase の機能をアッセイするレポーターマウスより繊維芽細胞を分離し、上記のベクターをトランスフェクトし、タモキシフェンの添加によってのみ、Cre-recombinase の機能が現われるかどうかを確認したところ、タモキシフェンを添加した細胞のみで、機能が誘導されることを確認した。次いで、このベクターを用いて、23 ラインのトランスジェニックマウスを作成した。ついで、この Tg マウスとレポーターマウスの掛け合わせを行っており、その発現部位と強さ、タモキシフェンによる誘導等を調べている。

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誘導的に変異を導入し、時間経過を追って、神経細胞死を解析する予定である。

Cre-recombinase とタモキシフェン受容体のリガンド結合ドメインとのキメラ蛋白はリガンドであるタモキシフェンに極めて強く依存して機能を発揮することが推定され、目的にかなうシステムであると判断される。

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。次いで、誘導的にターゲッ

ト遺伝子の機能を改変することが可能であることが示唆された。

F. 研究発表

- 1) Sone M., Hoshino M., Suzuki E., Saigo K., Nabeshima Y., and Hama C. Still life, a protein in synaptic terminals of *Drosophila* homologous to GDP-GTP exchanger. *Science* **275**, 543-547 (1997)
- 2) Takahashi S., Onodera K., Motohashi H., Suwabe N., Hayashi N., Yanai N., Nabeshima Y., and Yamamoto M. Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 12611-12615 (1997)
- 3) Sakamoto K., Yan L., Imai H., Takagi M., Nabeshima Y., Takeda S., and Katsube K. Identification of a chick homologue of Fringe, C-Fringe 1. Involvement in the neurogenesis and the somitogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **234**, 754-759 (1997)
- 4) Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Yamamoto M., and Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **236**, 313-322 (1997)
- 5) Miyagoe Y., Terashima T., Nonaka I., Hanaoka K., Hayasaka M., Nabeshima Y., Arahata K., Nabeshima Y., and Takeda S. Laminin $\alpha 2$ chain-null mutant mice by targeted disruption of the Lama 2 gene: A new model of merosin (laminin 2)-deficient congenital muscular dystrophy. *FEBS Letters* **415**, 33-39 (1997)
- 6) Kuro-o M., Matsumura Y., Aizawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T., Ohyama Y., Kaname T., Kume E., Iwasaki H., Iida A., Shiraki-Iida T., Nishikawa S., Ryoze N. and Nabeshima Y. Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **390**, 45-51 (1997)
- 7) Kameya S., Araki E., Katsuki M., Mizota A., Adachi E., Nakahara K., Nonaka I., Sakuragi S., Takeda S., and Nabeshima Y. Dp260 disrupted mice revealed prolonged implicit time of the b-wave in ERG and loss of accumulation of beta-dystroglycan in the outer plexiform layer of retina. *Human Molecular Genetics* **6**, 2195-2203 (1997)
- 8) Ikeshima-Kataoka H., Skeath J.B., Nabeshima Y., Doe C.Q., and Matsuzaki F. Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature* **390**, 625-629 (1997)

- 9) Yoshida N, Yoshida S., Fujisawa-Sehara 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)
- 10) Matsumura Y., Aizawa H., Shiraki-Iida T., Nagai R., Kuro-o M., and 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)
- 11) Shiraki-Iida T., Aizawa H., Matsumura Y., Sekine S., Iida A., Anazawa H., Nagai R., Kuro-o M., and Nabeshima Y. Structure of the mouse Klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Letters* 424, 6-10, (1998)
- 12) Okuda A., Fukushima A., Nishimoto M., Orimo A., Yamagishi T., Nabeshima Y., Kuro-o M., Nabeshima Y., Boon K., Keaveney M., Stunnenberg H.G., and Muramatsu M. UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *EMBO J.* 17, 2019-2032 (1998)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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.* 12, 2724-2734 (1998)
- 17) 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)
- 18) 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., and Nagai R. Molecular cloning of Rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* in press
- 19) Yamashita T., Nifuji A., Furuya K., Nabeshima Y., and 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)
- 20) Hoshino M., Suzuki E., Miyake T., Sone M., Komatsu A., Nabeshima Y., and Hama C. Neural expression of Hikaru genki protein during embryonic and larval development of Drosophila melanogaster. *Development Genes and Evolution* 209, 1-9 (1999)
- 21) Kameya S., Miyagoe-Y., Nonaka I., Ikemoto T., Endo M., Honaoka K., Nabeshima Y., and Takeda S., a1-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)
- 22) Ishi A., Hagiwara Y., Saito Y., Yamamoto K., Yuasa K., Sato Y., Arahata K., Shoji S., Nonaka I., Saito I., Nabeshima Y., and Takeda S. Effective adenovirus mediated gene expression in adult murine skeletal muscle. *Muscle & Nerve* 22, 592-599, (1999)
- 23) Hoshino M., Sone M., Fukuta M., Kuroda S., Kaibuchi K., Nabeshima Y., and Hama C. Identification of the stef gene that encodes a novel guanine nucleotide exchange factor specific for Rac I. *J. Biol. Chem.* 274, 17837-17844 (1999)
- 24) Murata S., Kawahara H., Tohma S., Yamamoto K., Kasahara M., Nabeshima Y., Tanaka K., and Chiba T. Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28g. *J. Biol. Chem.* 274, 38211-38215 (1999)
- 25) Inobe M., Katsube K., Miyagoe Y., Nabeshima Y., and Takeda S. Identification of EPS8 as a Dvl1-associated molecule. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 266, 216-221 (1999)
- 26) Yamashita T., Yoshitake H., Tsuji K., Kawaguchi N., Nabeshima Y., and Noda M. Retardation in bone resorption after bone marrow ablation in Klotho mutant mice. *Endocrinology* 141, 438-445 (2000)
- 27) Kato Y., Arakawa E., Kinoshita S., Shirai A., Furuya A., Yamano K., Nakamura K., Iida A., Anazawa H., Koh

N., Iwano A., Fujimori T., Kuro-o M., Hanai N.,
Takeshige K., and Nabeshima Y.

Establishment of the anti-Klotho monoclonal antibodies
and detection of Klotho protein in kidneys.

Biochem. Biophys. Res. Comm. in press

28) Yamashita T., Nabeshima Y., and Noda M.
High-resolution mCT (micro-computed tomography)

analyses of the abnormal trabecular structures in Klotho
gene mutant mice. *J. Endocrinology* in press

29) Seiji Okada, Toru Yoshida, Zhang Hong, Genichiro
Ishii, Masahiko Hatano, Makoto Kuro-o, Yoko
Nabeshima, Yo-ichi Nabeshima, and Takeshi Tokuhisa.

Impairment of B lymphopoiesis in precocious aging
(klotho) mice *Int. Immunol.* in press