

平成13年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

## コンディショナル・ノックイン法による受容体機能変換マウス作成と情報伝達機構の解析

所属 国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第七部

氏名 笹岡 俊邦

### 分担研究者

国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第七部 金子 清俊

### 要 旨

本研究は、神経疾患のひとつ、パーキンソン病の病態解明及び新たな治療用薬物開発に重要な情報の提供を目指し、独自の方法（コンディショナルノックイン法）により受容体機能を変換した遺伝子改変マウスを作成し、関連分子群の同定と情報伝達機構の解明を行う。

#### 1. 研究の目的

本研究は、パーキンソン病の病態解明、ならびに新たな治療用薬物の開発に重要な情報を提供することを目指して、我々がこれまでに開発した変異導入法により受容体機能変換マウスを作成し、プロテオーム解析法を応用して受容体関連分子の探索と情報伝達機構の解明を行う。

パーキンソン病の病態の進行、薬物反応性の変化には受容体分子の機能変化が関わりと考えられる。パーキンソン病の責任病巣、黒質線条体回路の主要分子であるドーパミン受容体は病態理解の上でも治療用薬物の標的としても重要な分子である。本研究では、受容体の「脱感受性」機能に焦点を当て、受容体の脱感受性による情報伝達の変化を明らかにし、病態の進行を阻止する治療の方策を浮かび上がらせることを目的とする。

個体を用いる遺伝子機能解析は、遺伝子ノックアウト法により急速に進歩したが、従来の方法では、対象分子の欠損でマウスの致死や、重度の発達異常により、焦点を絞った解析が困難であることなど問題点が多い。また、対象分子へのアミノ酸置換による機能変換を個体で解析する方法も求められている。我々はこの問題点にブレークスルーを図るため、RNA スプライシング機構と Cre-loxP 組換え機構を用いて、独自に「マウス個体の特定組織や特定時期で対象分子にアミノ酸置換による機能変換を導入するシステム（コンディショナルノックイン法）」を開発し、NMDA 受容体を対象として特定細胞群における機能変換マウスの作成に成功し、計画通りの変異導入と NMDA 受容体機能変換を確認した。

また、プリオンを介する情報伝達・プリオン代謝機構は、神経伝達物質受容体のそれらと共通点が

見いだされており、分担研究者らが進めているプリオン関連分子のプロテオーム解析により得られた知見は、ドーパミン受容体の情報伝達機構の解明、関連する新規分子群の探索に重要な情報をもたらすものである。

本研究では、ドーパミン受容体の脱感受性機能に重要なアミノ酸に着目し、当該アミノ酸を変換したドーパミン受容体機能変換マウスを作成し、薬物への反応性の変化を解析し、さらにプロテオーム解析法を用いて脱感受性に関与する分子群の探索と、脱感受性の分子機構の解明を行う。

本研究で作成するドーパミン受容体機能変換マウスを、病態モデル動物として、また細胞供与体として、創薬研究へ有用なものとしたい。

## 2. 研究方法

### (1) 対象遺伝子にアミノ酸置換を導入する方法の開発

NMDA 受容体のマグネシウムブロック機能に必須のアミノ酸を置換するため、正常エクソンと変異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 つのエクソン間に人工イントロンを挿入したベクターを構築し、ES 細胞による相同組換えによりマウス内在の NMDA 受容体遺伝子を改変し、マウス個体(NMDAR-floxP マウス)を作成した。この状態では 2 つのエクソン間の人工イントロンの性質により、絶えず正常エクソンのみが発現される。正常エクソンを欠失させると変異エクソンが利用され、転写産物にアミノ酸置換が導入される。正常エクソンを欠失させる方法として P1 ファージ由来の Cre-loxP 組換えシステムを利用する。

上記の方法を応用して、D2 ドーパミン受容体の第 3 細胞質領域を対象として、アミノ酸置換を導入する相同組換えベクターを構築する。この相同組換えベクターを ES 細胞に導入し、同様の方法で D2 ドーパミン受容体遺伝子を改変したマウス個体(D2R-floxP マウス)を作成する。

### (2) 特定細胞におけるアミノ酸置換の導入

神経細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現するトランスジェニックマウス(nestin-Cre マウス)を用意し、NMDAR-floxP マウスと掛け合わせ、得られた NMDAR-floxP-nestin-Cre マウスの変異導入の様式を観察したところ、計画通り神経細胞特異的に変異導入が行われていた。また電気生理学実験により NMDAR-floxP-nestin-Cre マウスの NMDA 受容体のマグネシウムブロック機能の変換が確認でき、本システムによるアミノ酸置換による機能変換が成功している結果を得た。

対象とする組織特異的に Cre-loxP 組換えによる変異導入を行うため、適切なプロモーターを選択して Cre 組換え酵素を発現するトランスジェニックマウスを作成する。本研究では、神経細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現するトランスジェニックマウス(nestin-Cre マウス)、またはドーパミン神経特異的に Cre 組換え酵素を発現するトランスジェニックマウス(DA-Cre マウス)を用意して、神経細胞全体、またはドーパミン神経細胞特異的に変異導入を行う。

### (3) 受容体関連分子群の解析

分担研究者のグループでは、プリオン蛋白関連分子の解析のためプロテオーム解析システムの確立が進

められている。細胞表面の特定分画に着目し、二次元電気泳動にて各タンパク質を展開し、特異抗体および質量分析を用いることにより、各スポットの分子の同定を行っている。この方法は、受容体分子等の膜タンパク質の関連分子のプロテオーム解析に重要な知見をもたらすものであり、確立が進められている解析方法を応用して、神経伝達物質受容体関連分子の探索を行ってゆく。

### 3. 研究成果

(1) 我々がこれまでに作成した、NMDA受容体アミノ酸置換マウスについて、変異導入の様式を調べたところ、脳、脊髄、生殖細胞の一部に特異的に変異が導入されていた。変異型NMDA受容体mRNAは、Cre-loxP組換えの後にのみ発現しており、NMDA受容体のマグネシウムブロック機能も変換されていた。また、このNMDA受容体MRNA及びタンパクの発現量、並びに発現部位は内在の遺伝子発現様式に従っており、アミノ酸変異による機能変換の効果のみを観察できるシステムであることが明らかになった。

(2) D2ドーパミン受容体(D2R)の脱感受性機能に着目し、第3細胞質領域を変異導入の対象部位として、「コンディショナルノックイン法」により、アミノ酸置換を導入するマウスの作成を進めている。まず、マウスD2R遺伝子を含むBACクローンを単離し、D2R遺伝子の構造解析を行い、アミノ酸置換マウス作成用のベクターの構築を行っている。

(3) パーキンソン病の責任病巣である、黒質線条体ドーパミン神経に特異的にCre-loxP組換えにより変異を導入する目的で、Cre組換え酵素を発現させるトランスジェニックマウス(DA-Creマウス)を作成している。ドーパミン生合成酵素、チロシン水酸化酵素遺伝子プロモーターを用いて、Cre組換え酵素を発現させるトランスジェニックマウスを6系統作成し、ドーパミン神経で適切な組換えを示す系統を選抜している。

(4) プリオンタンパク質関連分子群の解析を目的とした、二次元電気泳動による膜タンパク質の分離、タンパク質スポットの質量分析によるアミノ酸配列の同定の方法、並びにファージミド抗体を用いた標的タンパク質の同定の方法について、効率、感度の点についてのデータが蓄積されてきている。

(倫理面への配慮) 本研究に含まれるすべての動物実験はマウス個体を対象とし、実験動物の飼育及び使用は、実験実施場所である国立精神・神経センターが定める「動物実験に関する倫理指針」に基づき、承認された研究計画のもとで実施した。

### 4. 考察

RNAスプライシングの機構およびCre-loxP組換えの機構を用いて開発した「コンディショナルノックイン法」により、特定細胞において対象遺伝子にアミノ酸置換による機能変換が可能であることが確認された。この方法は、変異導入後の対象遺伝子の発現量、発現部位が、内在の遺伝子発現様式に従っており、変異分子の機能変換を観察できることも明らかとなった。これらの点は、従来の遺伝子操作マウス作成法の問題点を克服するものである。

しかし、対象遺伝子のエクソンを、「loxP-正常エクソン-loxP-人工イントロン-変異エクソン」という構造に変換する過程について、ベクター作成の簡便化、相同組換え体の単離の高効率化など、改善する点がある。

また、解析対象とする特定時期においてCre-loxP組換えを行うことを目的として、薬物投与により誘導的にCre組換え酵素を発現してCre-loxP組換えを行うため、適切な誘導系の開発を、引き続き行ってゆく必要がある。

これまで進められたプリオンタンパク質関連分子のプロテオーム解析方法を神経伝達物質受容体の関連分子の解析に応用するにあたり、今後、条件の検討を進める予定である。

## 5. まとめ

我々が、これまでに開発した「コンディショナルノックイン法」により、ヒトの神経疾患の病態解明および治療薬物に重要な、神経伝達物質受容体の機能の上昇または低下を導入した遺伝子操作マウスを作成し、受容体の機能変換に関わる関連分子の探索、病態機構の解明、新たな治療薬の標的候補分子の探索に発展させる。ドーパミン受容体を対象として、脱感受性機構に関わる領域と関連分子群を明らかにすることを当面の目標として、ドーパミン受容体機能変換マウスの作成を進め、受容体関連分子のプロテオーム解析により、新たな知見を得ることを目指している。

## 6. 研究発表

1) Noguchi, S., Wakabayashi-Takai, E., Sasaoka, T. and Ozawa, E.: Analysis of the spatial, temporal and tissue-specific transcription of gamma-sarcoglycan gene using a transgenic mouse.

FEBS Letters, 495, 77-81, 2001

2) Sasaoka, T., Imamura, M., Araishi, K., Noguchi, S., Mizuno, Y., Takagoshi, N., Hama, H., Wakabayashi-Takai, E., Yoshimoto-Matsuda, Y., Nonaka, I., Kaneko, K., Yoshida, M., and Ozawa, E.: Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in gamma-sarcoglycan-deficient mice. *Neuromusc. Disord.* (Submitted)

## 7. 知的所有権の取得状況:

- |           |    |
|-----------|----|
| 1) 特許事項   | なし |
| 2) 実用新案登録 | なし |
| 3) その他    | なし |

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社