

## 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  
研究者 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

神経疾患の病態解明及び治療薬物の標的として重要な分子である神経伝達物質受容体に着目し、独自に開発したコンディショナル変異導入法により、受容体機能を変換した疾患モデルマウスを作成し、病態機構の解明・受容体関連分子の探索・新たな治療薬物標的分子の探索を行なう。

### 1. 研究目的

本研究は、神経疾患のひとつである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、申請者らが独自に開発した変異導入法(コンディショナル変異導入法)により受容体に機能変換を導入した遺伝子改変マウスを作成し、情報伝達機構の解明、関連分子群の同定、新たな治療薬物標的分子の探索を行う。

パーキンソン病の病態の進行ならびに薬物治療における反応性変化には受容体分子の機能変化が関わると考えられる。責任部位である黒質線条体回路において、NMDA型グルタミン酸受容体(NMDAR)および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。病態の分子機構を解明し、現在の治療の問題点を克服し、新たな治療法開発の可能性を持つ標的分子を見いだすため、受容体分子の活動性の上昇または低下を導入したマウスを作成して基礎研究を進めることが必要である。本研究では、受容体の活動性に焦点を当て、受容体の活動性変化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指し示すことを目的とする。

遺伝子ノックアウト法による個体を用いた遺伝子機能解析の問題を解決するため、独自の方法で「マウス個体の特定組織や特定時期で対象分子のアミノ酸置換による機能変換を導入するシステム(コンディショナル変異導入法)」を開発し、神経細胞特異的にNMDARにアミノ酸置換を導入したマウスを作成した。

本研究では、NMDAR機能変換マウスを用いて、神経症状の基盤の分子機構を解明し、受容体の活性化に関与する分子群の同定と、新しい治療標的分子候補を見出したい。

受容体関連分子群のプロテオーム解析を行うため、当初は、プリオンタンパク質関連分子の一括解析を対象としたプロテオーム解析システムを構築し、受容体関連分子を標的とした一括解析に応用する。

変異型NMDAR配列を認識する特異抗体は、発現解析に必須であり、かつNMDAR異常活性化を抑制する治療分子としての役割も期待される。従来の抗体作成方法に加え、新たな人工抗体作成法により、治療分子として有用な抗体の作成を行う。

「コンディショナル変異導入法」を用いてドーパミン受容体の活動性に重要な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、NMDAR機能変換マウスと同様の解析を行う。

本研究で作成する、NMDAR機能変換マウス及びドーパミン受容体機能変換マウスは、病態モデル動物として、また細胞供与体として、創薬研究へ有用な貢献ができるものである。

## 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：

「コンディショナル変異導入法」は、RNA スプライシング機構と Cre-loxP 組換え機構を応用している。NMDAR はコドン 595 番目のアスパラギンをグルタミンへ置換されると異常活性化がみられる。Cre-loxP 組換え前には、アスパラギンをコードする正常エクソンのみが発現し、組換え後にグルタミンをコードする変異エクソンが発現する状態を作り出すため、正常配列エクソンと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 つのエクソン間には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を利用して、loxP-正常エクソン-loxP-人工イントロン-変異エクソンの構造をもつマウス個体(*NR2A flox/flox* マウス)を作成する。この状態では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、変異エクソンは発現されない。Cre 発現トランスジェニックマウスと掛け合わせ、Cre-loxP 組換えにより正常エクソンを欠失させると変異エクソンが発現されるようになる。

### (2) 標的細胞特異的なアミノ酸置換の導入：

目的とする特定細胞で Cre-loxP 組換えによる変異導入のため、標的細胞特異的な発現を誘導するプロモーターを用いて、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、*nestin* プロモーターを用いて、広く神経細胞に 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)を作成し、*NR2A flox/flox* マウスと掛け合わせ、*NR2A +/flox-nestin-Cre* マウスを得て、アミノ酸置換を導入した。

### (3) NMDAR 阻害薬の投与による神経症状の抑制：

NMDAR の拮抗的阻害薬・非拮抗的阻害薬を用いて、*NR2A +/flox-nestin-Cre* マウスの神経症状の抑制効果を検討した。

### (4) アミノ酸置換部位を認識する抗体の作成：

コンディショナル変異導入法による変異導入様式を解析するため、NMDAR のアミノ酸置換部位の正常型アミノ酸配列・変異型アミノ酸配列に対し、それぞれ特異的に認識する抗体の作成を行った。

### (5) 特定神経細胞における変異導入：

(a) ドーパミン神経特異的に変異導入を目的として、ドーパミン生合成酵素であるチロシン水酸化酵素プロモーターを用いて Cre 発現トランスジェニックマウスを作成した。Cre-loxP 組換えを検出するマーカー遺伝子をもつマウスと掛け合わせ、ドーパミン神経において組換えを確認した。

(b) 大脳皮質特異的に Cre を発現するマウスを準備し、同様に特定神経細胞における変異導入を進めてきた。

### (6) ドーパミン受容体機能変換マウスの作成：

「コンディショナル変異導入法」により、D2 ドーパミン受容体(DRD2)の活動性に重要なアミノ酸配列を置換した DRD2 機能変換マウスを作成する。マウス DRD2 遺伝子をクローニングし、当該領域のアミノ酸置換を導入するための相同組み換えベクターを構築し、ES 細胞を用いた相同組換え法によりマウスを作成する。

### (7) 受容体関連分子のプロテオーム解析系の確立：

標的分子の数を絞るために、我々は細胞表面上のコレステロールやスフィンゴ糖脂質に富んだ部分に親和性を有する蛋白質に着目し、プリオン蛋白質関連分子を標的としたプロテオーム解析系を確立する。具体的には、まず二次元電気泳動により各蛋白質スポットを分離した後、ファージディスプレイライブラリーの手法を用いて、各スポットに対応するファージミッド抗体を効率よくスクリーニングし分離生成する方法 (2D-PP法)を確立する。

### 3. 研究成果

#### (1) 特定細胞におけるアミノ酸置換の導入と機能変換：

我々がこれまでに作成した、*NR2A flox/flox* マウスと、神経細胞特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウス (*nestin-Cre* マウス) を掛け合わせて変異導入を行ったマウス (*NR2A +/flox-nestin-Cre* マウス) においては、脳・脊髄で Cre-loxP 組換えが見出された。さらに、組換えを検出するマーカー遺伝子を持つマウスを利用し、神経細胞特異的に組換えが観察された。NMDAR mRNA とタンパクの発現を生化学的、免疫組織化学的に解析した。変異型 NMDAR mRNA は、Cre-loxP 組換えの後にのみ発現していることが明らかになった。また、この NMDAR mRNA 及びタンパクの発現量、並びに発現部位は、Cre-loxP 組換えの前後で、明らかな差異はなかった。このことは、我々の方法が、変異型分子の発現量・発現部位が、内在の遺伝子発現様式に従っており、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を示している。

電気生理学実験により *NR2A +/flox-nestin-Cre* マウスの NMDAR 活性化が確認でき、アミノ酸置換による機能変換が成功していることが示された。

#### (2) *NR2A +/flox-nestin-Cre* マウスの薬理的解析：

当該 *NR2A +/flox-nestin-Cre* マウスにみられる神経症状を治療する目的で、種々の NMDAR 阻害薬の神経症状の治療効果を検定したところ、非拮抗型阻害薬により抑制された。このことは、変異導入による NMDAR 活性化状態と、この阻害薬が作用する受容体活性化状態が一致することを示唆している。これまでの研究成果は、論文投稿予定である。

#### (3) NMDAR のアミノ酸置換部位を認識する抗体の作成：

NMDAR のアミノ酸置換部位の正常型アミノ酸配列・変異型アミノ酸配列を認識するポリクロナル抗体の作成を行い、正常型アミノ酸配列を認識する抗体が得られた。変異導入様式の解析には変異型アミノ酸配列に対する抗体も必須であり、引き続き抗体作成を進めている。

#### (4) ドーパミン受容体機能変換マウスの作成：

D2 ドーパミン受容体 (DRD2) の活動性変化に着目し、機能に重要な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 DRD2 cDNA をプローブとしてマウスゲノム DNA BAC ライブラリーからマウス DRD2 遺伝子を含むクローンを単離し、DRD2 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進めている。

#### (5) 受容体関連分子のプロテオーム解析：

二次元電気泳動による各蛋白質スポットの分離及び質量分析によるアミノ酸配列の同定 (2D-PP法) は、陽性抗体の同定率が現時点では 20% 程度にとどまり、未だその実用性に問題がある。しかしながら、独創的かつ実用化の期待される技術として、本方法の概念に関する特許が取得された点は特筆される。

### 4. 考察

われわれがこれまでに開発した「コンディショナル変異導入法」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を明瞭に示した。さらに、対象遺伝子の発現量、発現部位は、内在遺伝子の発現様式に従っており、変異分子の機能変換のみを観察できることも明らかとなった。これらの点は、従来のトランスジェニックマウス法・ノックアウトマウス法による問題点を克服したものであり、本実験システムは対象分子の情報伝達機構の解明、ならびに相互作用する分子群の探索に貢献できるものである。

この「コンディショナル変異導入法」は、あらゆる遺伝子が対象となり、がん、循環器疾患、感染症、代謝性疾患を始め、common diseases の疾患研究のために広い応用が可能である。実験技術的には、対象遺伝子エクソンを、ES 細胞を用いた相同組換え法により「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は、ES細胞へのベクター導入および薬剤選択を2段階必要とすること、並びに相同組換え体を得られる頻度を改善すること等、今後検討する必要がある。

解析目的とする特定時期にCre-loxP組換えを行うことを目的として、薬物投与によりCre発現を誘導して組換えを行うため、現在のテトラサイクリン誘導系の問題点を改善し、適切な実験系の開発を引き続き行ってゆく必要がある。

正常型プリオン蛋白質を用いたプロテオーム解析システムを用いた検討の結果、受容体分子を含む様々な蛋白質の活動性に関連する蛋白質群の発現量の変動を検出できるが、それぞれの蛋白質に対するフェージド抗体の同定効率に関しては、現時点の方法では十分とは言えず、更なる検討が必要である。

変異型NMDAR配列を認識する特異抗体は、発現様式に重要な情報を与えるだけでなく、変異分子の機能を抑制する治療分子としての役割を期待できる。国立精神・神経センター神経研究所 田中寅彦博士(分担研究者予定)は、新たな人工抗体作成方法の研究実績があり、今後共同して、治療分子として有用な人工抗体作成を進める。

遺伝子変異マウスによる機能解析の順遺伝学(Forward genetics)的アプローチとして、ジーントラップ技術は、網羅的かつ効率的な方法である。奈良先端技術大学院大学 石田靖雅博士(分担研究者予定)は、独自のジーントラップ法を考案し、ES細胞を用いたランダムかつ高効率な遺伝子ノックアウトマウスの作成のシステムを開発してきた。今後共同して、トラップした遺伝子プールにドーパミン神経障害に関連する遺伝子を見出し、遺伝子変異マウスを高効率に作成するアプローチにより機能解析を進める。

## 5. まとめ

我々が開発した「コンディショナル変異導入法」により、ヒト神経疾患の病態機構解明および治療薬物標的として重要な分子である、神経伝達物質受容体の機能変換を導入した遺伝子操作マウスを作成し、変異導入の様式、機能変換による表現型の解析、治療法の可能性の検討を行なった。あわせて、受容体関連分子の一括解析を目的としたプロテオーム解析システムとして、2D-PP法を検討した。

今後、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。

## 6. 研究発表

主任研究者 笹岡 俊邦

「英文原著論文」

(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*, Vol.495, 77-81, 2001

(2) Dressman, D., Araishi, K., Imamura, M., Sasaoka, T., Liu, L., Engvall, E., and Hoffman, E. P.:

Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity.

*Human Gene Therapy*, Vol.13, 1631-1646, 2002

(3) 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.

*Neuromuscular Disorders*, Vol.13, 193-206, 2003

(4) Esumi, E., \*Sasaoka, T., \*Yoshimoto-Matsuda, Y., \* (\*equal contribution) Nabeshima, Y., Manabe, T., Takagoshi, N., Noguchi, S., Tsukahara, K., McKernan, T. L., Tanaka, T., Sakimura, K., Miyazaki, J.-i., Kaneko, K., Ozawa, E., Mishina, M, and Nabeshima, Y.:  
Conditional mutagenesis by neural-tissue-restricted substitution of a single amino acid causes aberrant NMDAR activation in mice.  
(To be submitted)

「英文著書」

(1) Wang, Y., Xu, R., Sasaoka, T., and Sankoorikal, E.-B.  
Dopamine D2L receptor knockout mouse provides a unique model system for studying the functions of D2L and D2S.  
In: *Catecholamines: From Molecular Insights to Clinical Medicine (Advances in Behavioral Biology, Vol 53)*,  
Editors; Nagatsu T., Nabeshima T., McCarty R., Goldstein D., pp.175-178.  
Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002

「国際学会 シンポジウム発表」

(1) Wang, Y., Xu, R., Sasaoka, T., Tonegawa, S., Kung, M.-P. and Sankoorikal, E.-B.:  
Dissecting the functions of two isoforms of dopamine D2 receptor using genetically altered mice.  
The 9th International Catecholamine Symposium, Kyoto, Japan, April 4, 2001  
(2) Sasaoka T., Yoshimoto-Matsuda Y., Esumi E., Nabeshima Y., Manabe, T., Noguchi, S., Miyazaki, J.-i., Kaneko, K., Mishina M., and Nabeshima Y.:  
Development of a new method for an amino acid substitution in mice.  
The 9th International Catecholamine Symposium, Kyoto, Japan, April 4, 2001

「国際学会 一般演題発表」

(1) Hagiwara Y., Sasaoka T., Araishi K., Imamura M., Yorifuji H., Nonaka I., Ozawa E., and Kikuchi T.:  
Caveolin-3 deficiency leads to muscle degeneration in mice.  
6<sup>th</sup> International Congress of World Muscle Society, Snowbird, Utah, USA, September 7, 2001  
(2) Dressman, D., Liu, L., Engvall, E., Araishi, K., Imamura, M., Sasaoka, T., Ozawa, E., and Hoffman E.P.:  
Alpha- and beta-sarcoglycan delivery by AAV: efficient rescue of muscle, but differential persistence of gene expression.  
The American Society of Human Genetics, 51st Annual Meeting, San Diego, California, USA, October 16, 2001  
(3) Fetsko, L.A., Xu, R., Sasaoka, T., Tonegawa, S., Kung, M.-P. and Sankoorikal, E.-B., and Wang Y.:  
Analysis of dopamine D2 long receptor-deficient mice  
Society for Neuroscience The 31<sup>st</sup> Annual Meeting, San Diego, USA, November 14, 2001  
(4) Dressman, D., Araishi, K., Imamura, M., Sasaoka, T., Liu, L., Engvall, E., and Hoffman,

E.P.:

Alpha- and Beta-Sarcoglycan Delivery by AAV: Efficient Rescue of Muscle, but Differential Persistence of Gene Expression

Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, July 8, 2002

(5) Dressman, D., Gordish, H., Araishi, K., Imamura, M., Sasaoka, T., and Hoffman E.P.:

Immunostimulatory Properties of Dystrophic Muscle Alter Persistence of Transgenes Unless Biochemically Rescued

Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, Vancouver, Canada, July 10, 2002

(6) Dressman, D., Araishi, K., Imamura, M., Sasaoka, T., Liu, L., Engvall, E., and Hoffman, E.P.:

Alpha- and Beta-Sarcoglycan Delivery by AAV: Efficient Rescue of Muscle, but Differential Persistence of Gene Expression

The American Society of Human Genetics, 52nd Annual Meeting, Baltimore, Maryland, USA, October 16, 2002

(7) Hoffman, E. P., Gordish, H., Araishi, K., Imamura, M., Sasaoka, T., and Dressman, D.:

Immunostimulatory Properties of Dystrophic Muscle Alter Persistence of Transgenes

The American Society of Human Genetics, 52nd Annual Meeting, Baltimore, Maryland, USA, October 17, 2002

「国内学会 シンポジウム発表」

(1) 笹岡俊邦、松田由喜子、江隅英作、鍋島曜子、真鍋俊也、野口茂、宮崎純一、金子清俊、三品昌美、鍋島陽一

コンディショナル・ノックイン法の開発による NMDA 受容体アミノ酸置換マウスの作成  
第 24 回 日本分子生物学会年会 シンポジウム S4aC 「ポストゲノムを支えるモデル生物：マウス」横浜、12 月 12 日、2001 年

分担研究者 金子清俊

「英文原著論文」

(1)Furuta M., Ito T., Eguchi C., Tanaka T., Wakabayashi-Takai E., Kaneko K.:

Two-Dimensional Electrophoresis/Phage Panning (2D-PP): A Novel Technology for Direct Antibody Selection on 2-D Blots.

*Journal of Biochemistry (Tokyo)*, **132**: 245-251, 2002

(2)Tanaka T., Ito T., Furuta M., Eguchi C., Toda H., Wakabayashi-Takai E., Kaneko K.:

In Situ Phage Screening. A method for identification of subnanogram tissue components *in situ*.

*Journal of Biological Chemistry*, **277**: 30382-30387, 2002

口頭発表

「関連国際学会一般講演」

なし

「国内・国際学会特別講演、シンポジウム」

1) 金子清俊. ファージミド抗体ライブラリーを用いた新しいプロテオーム解析手法開発の試み. 所長招聘セミナー. 岡崎国立共同研究機構 生理学研究所, 岡崎, 7.18, 2001.

- 2) Tanaka T, Ito T, Furuta M, Eguchi C, Toda H, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K. In situ phage screening; screening a scFv library on nanogram-sized tissue samples. Understanding Phage Display 2003, Vancouver, Canada, Jan 17-20, 2003

[一般講演]

- 1) 古田大、江口陸志、伊藤卓、高井恵理子、田中寅彦、金子清俊. 二次元分離タンパク質群に対する特異ファージ抗体の取得. 第24回日本分子生物学会年会. 横浜, 12.9-12, 2001.
- 2) 田中寅彦、伊藤卓、古田大、江口陸志、戸田宏幸、高井(若林)恵理子、金子清俊. In situ phage screening; single chain Fv ファージライブラリーを用いた、組織切片中の微量抗原同定法. 第25回日本分子生物学会年会. 横浜, 12.11-14, 2002.

7. 知的所有権の取得状況

主任研究者 笹岡 俊邦

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

分担研究者 金子清俊

- (1) 特許事項  
      「高効率抗体スクリーニング法」日本国特許庁(第3375941号)/PCT/JP01/04732  
      「高効率抗体スクリーニング法-2」日本国特許庁(出願番号第2000-373259号)
- (2)実用新案登録           なし  
(3)その他                   なし