

平成15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

# 目 次

## 課題番号

文献 No 2003885A KH11001	ハイスループットスクリーニングを指向した細胞機能解析法の開発研究
KH11002 886A	ゲノム創薬を支援する高感度分析・解析技術の開発・応用に関する研究
KH11003 887A	疾患モデル動物の開発および保存のための高度発生工学技術の確立
KH11004 888A	トランスジェニックラットの作成とその公共利用のための胚バンクの検討
KH11005 889A	癌細胞の標的化を可能にするベクターの開発；単クローン抗体からペプチドへの展開
KH11006 890A	遺伝子改変動物をもちいたGタンパク質共役型受容体の機能解析
KH11007 891A	新しい白血球の機能制御手法を適用したガン細胞の浸潤・転移抑制方法の開発研究
KH11008 892A	多剤耐性結核の診断と創薬探索技術としてのゲノム解析に関する研究
KH12079 893A	超機能性核酸類縁体（BNA）を用いたアンチセンス医薬品の開発とその実践的応用
KH12084 894A	コンディショナルノックイン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

川 西 徹	.....	1
今 井 一 洋	.....	11
小 倉 淳 郎	.....	19
小 林 英 司	.....	25
石 坂 幸 人	.....	32
田 上 昭 人	.....	37
鈴 木 和 博	.....	53
切 替 照 雄	.....	65
今 西 武	.....	78
笹 岡 俊 邦	.....	82

## コンディショナルノックイン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 岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所  
形質転換生物研究施設

研究者 笹岡 俊邦

研究要旨 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特定アミノ酸配列を置換し受容体機能を変換した変異マウスを作成した。受容体阻害薬による神経症状の治療効果を検討した。変異分子の発現解析・治療用抗体開発のため人工抗体作製法を用いて標的分子の変異アミノ酸に対する抗体作成を行った。また、神経疾患原因遺伝子のノックアウトマウスの効率的作成のため、遺伝子トラップ法により得たES細胞クローンから変異マウスを作成した。

### 分担研究者

- (1) 国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第七部 田中 寅彦
- (2) 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 動物遺伝子機能学講座 石田 靖雅

### A. 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、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において、NMDA型グルタミン酸受容体(NMDAR)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。

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。

本研究で作成する、NMDAR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。

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。トラップされた遺伝子プールの中に関連する遺伝子ノックアウトクローンを検索し、変異マウスを作成する。

### B. 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 の NR2A サブユニットはコドン 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、正常エクソンのみが発現し、組換え後に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* マウスと掛けあわせ、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 マウスに投与し、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) *Emx1* 遺伝子プロモーターによる発現制御のもとで、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) 遺伝子トラップ法により集積される遺伝子プールの中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。

#### (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基礎生物学研究所、国立精神・神経センター、及び奈良先端科学技術大学院大学が定める「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行った。

### C. 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 の異常活性化が確認でき、アミノ酸置換による機能変換が行われ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ほぼ完全に抑制された。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中である。

(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ウサギポリクロー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。あわせて、ファージミド抗体による特異抗体作製法も検討した。

(4) ジーントラップ法によりプールされた ES クローンの中にドーパミン神経障害に関連する  $\epsilon$  サルコグリカン遺伝子を見出し、当該遺伝子変異マウスを作成した。

#### D. 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・発現部位をかえることなく、変異分子の機能変換のみを観察できることも示された。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。

本研究で開発されたマウスは、NMDAR の特異的阻害薬の個体を用いた検定系として今後の有用性が高い。

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。ウサギポリクローナル抗体による方法とともにファージミド抗体による方法も応用して、治療分子として有用な人工抗体作成を進める。

ジーントラップ法により次々とトラップされる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。

#### E. 結論

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。

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。

#### F. 研究発表

主任研究者 笹岡 俊邦

##### 1. 論文発表

(1) 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

(2) 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. (Submitted)

(3) Yuji Mizuno, Jeffrey R. Guyon, Simon C. Watkins, Kazuyuki Mizushima, Toshikuni Sasaoka, Michihiro Imamura, Louis M. Kunkel, Koichi Okamoto:

Beta-Synemin localizes to regions of high stress in human skeletal myofibers. (In revision)

## 2. 国内学会 シンポジウム発表

今井文康、平井秀一、秋本和典、河口篤美、小川洋道、宮田卓樹、野口茂、笹岡俊邦、野田哲生、大野茂男

哺乳類神経上皮細胞における aPKC $\lambda$  の役割:

神経上皮特異的 aPKC $\lambda$  KO マウスの解析

第 26 回 日本分子生物学会年会 神戸、12 月 11 日、2003 年

分担研究者 田中寅彦

### 1. 論文発表

Tanaka T & Sasaoka T

Highly efficient unidirectional subcloning to obtain more than  $10^9$  transformants from 1 microgram of v

ector DNA (Submitted)

分担研究者 石田靖雅

### 1. 論文発表

Matsuda, E. et al. (2004).

Expression profiling with arrays of randomly disrupted genes in mouse embryonic stem cells leads to in vivo functional analysis.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4170-4174.

### 2. 学会発表

重岡ら、口頭発表 (2003年12月)。ジーントラップと mRNA サーベイランス: NMD 経路の抑制による高効率な poly A トラップシステムの確立。第 26 回日本分子生物学会年会 (於・神戸)。

## G. 知的財産権の出願・登録状況

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 田中寅彦

### 1. 特許

発明の名称: 連結 DNA の調製方法及びトランスフォーマントの調製方法

発明者: 田中寅彦、笹岡俊邦

特願 2004-20810

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

分担研究者 石田靖雅

### 1. 特許

特許権 (出願中)。特願 2002-310334。2002 年 10 月 24 日出願。発明者: 石田靖雅。

2. 実用新案登録 なし。

3. その他 なし。

---

平成15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16年9月30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