

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07712

研究課題名(和文) ミエリン形成の発光観察と操作によるアダルトミエリネーション仮説の検証

研究課題名(英文) Testing the Adult Myelination Hypothesis by Luminescence Observation and Manipulation of Myelin Formation

研究代表者

石本 哲也 (Ishimoto, Tetsuya)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：40397170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：成体で新しくミエリン形成が起きる現象(アダルトミエリネーション)が起きた細胞だけを観察する実験系の確立を目指した。そのために、オリゴデンドロサイトが成熟し、ミエリンを形成するときにだけ発現するBCAS1プロモーター制御下で、CreERT2とルシフェラーゼが同時発現するトランスジェニックマウスの作製を試みたが、ルシフェラーゼがBCAS1と共発現している証拠を得られなかった。その失敗を受け、コンストラクトをより単純にした、BCAS1プロモーター制御下でCreERT2が発現するマウスを作製し、現在解析を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当研究の目的であるアダルトミエリネーション仮説の検証は、研究期間内で終了することはできなかったが、Cre-loxpシステムは広く生物分野で用いられている発現制御システムであるので、BCAS1プロモーター制御下でCreERT2が発現するトランスジェニックマウスは、他の研究室に存在するloxpマウスやloxpアデノ随伴ウイルスなどと組み合わせることができる。それによりミエリン化が起きている最中のオリゴデンドロサイトのみに特定の蛋白質を発現させることができ、グリア細胞研究の推進に寄与することができる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish an experimental system in which only cells in which the new myelin formation (adult myelination) occurred in adults were observed. For that purpose, we tried to generate transgenic mice in which CreERT2 and luciferase are co-expressed under the control of the BCAS1 promoter, which is expressed only when oligodendrocytes mature and form myelin, but we could not obtain evidence that luciferase is co-expressed with BCAS1. In response to this failure, a simpler construct, a mouse in which CreERT2 is expressed under the control of the BCAS1 promoter, was generated and is currently being analyzed.

研究分野：分子神経科学

キーワード：ミエリン トランスジェニックマウス BAC オリゴデンドロサイト BCAS1

1. 研究開始当初の背景

ミエリンは髄鞘とも呼ばれ、オリゴデンドロサイトが中枢神経軸索上に形成する層状構造のことを言う。それにより神経細胞の跳躍伝導が可能になり、非ミエリン化軸索に比べ数十倍伝達効率が上昇する。ほとんどのミエリンは発生過程で形成されるが、脳内のすべての軸索がミエリン化されているわけではなく、成体になってからもミエリンの形成が起きるといった報告がなされてきた(アダルトミエリネーション)。さらに近年、運動学習、光遺伝学による神経細胞の刺激などによってアダルトミエリネーションが誘導されるという報告もある。また、ミエリンが統合失調症や多発性硬化症などの疾患において脱落しているという知見も古くから知られている。つまりミエリンは従来考えられてきたような静的なものではなく、状況によって増加したり減少したりする構造であるといえる。

ただしそのアダルトミエリネーションの研究は技術的な困難が伴う。学習とアダルトミエリネーションの関係を証明した論文では、オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)から成熟オリゴデンドロサイトへの分化を、転写因子のノックアウトにより、脳内全てでストップさせ、それにより学習効果が低下したという観察に基づいたものである。つまり実際のアダルトミエリネーションが脳のどの部位でどういった刺激に対して起きるのか、直接観察した報告はほとんどない。こうした状況下で、直接アダルトミエリネーションを観察する手法の開発が求められている。

2. 研究の目的

アダルトミエリネーション仮説が真実かどうか問うために行う実験として、一つ目にアダルトミエリネーションという現象を可視化検出すること、二つ目にアダルトミエリネーションを起こしている細胞だけを殺し、その脳機能に対する影響を解析することである。これらの実験を通してアダルトミエリネーションと脳機能の関係を明らかにすることが本研究の目的である。

一つ目の実験に関して、今まで脳内ミエリン量を計測するにはMRIの原理を利用した方法が多く取られてきた。しかしこれはアダルトミエリネーションだけを抽出して計測するわけではなく、水分子の動きを利用して白質の範囲を画像化する方法である。本申請では、これらと全く異なる手法でより直接的にアダルトミエリネーションの計測を行う。申請者が今まで技術開発を行ってきた発光蛋白質 luciferase を用いて、アダルトミエリネーションを起こしている細胞だけを生体マウス脳で発光計測する。これにより詳細かつ直接的にアダルトミエリネーションの解析を行うことができる。

二つ目の実験に関しては、Cre-loxp システムとジフテリアトキシンの毒性を利用して、発光計測を行ったマウスと同一個体で、ミエリネーションを起こしている細胞だけを殺す手法を確立する。この手法が確立できれば、アダルトミエリネーションとそれによって誘導される生体現象の因果関係を解析できる。このように本申請は、申請者独自の技術開発を基にして、アダルトミエリネーション仮説の検証を行うものである。

3. 研究の方法

申請者がクローニングした Breast carcinoma amplified sequence 1(BCAS1)遺伝子は、オリゴデンドロサイトに発現することはわかっていたが、近年ミエリン形成中のオリゴデンドロサイトに特異的に発現することが詳細な免疫組織化学的解析で明らかになった。今までオリゴデンドロサイト前駆細胞や成熟オリゴデンドロサイトに特異的に発現する遺伝子は知られていたが、ミエリン形成時のみオリゴデンドロサイトに発現する遺伝子は BCAS1 以外には報告がなく、本申請ではこの特性を利用して、BCAS1 プロモーターの制御下において luciferase と CreERT2 が発現するトランスジェニックマウスを作製する。この際、マウスの BCAS1 遺伝子座周辺約 200 kb を含む、マウスゲノムバクテリア人工染色体(BAC)を用いることで、BCAS1 のプロモーターを含む DNA 配列をマウスゲノムに取り込ませることができ、生体マウス脳内でミエリン形成が起きているオリゴデンドロサイトにのみ、luciferase を発現させ発光観察することが可能になる。

4. 研究成果

(1) BCAS1 プロモーター制御下で Cre リコンビナーゼとルシフェラーゼを発現するトランスジェニックマウスの作製

BCAS1 プロモーター領域を含むバクテリア人工染色体 (BAC) を有している大腸菌を理研パイオリソースから購入した。相同組み換えによる BAC の DNA 配列置換によって、翻訳開始点から CRE リコンビナーゼ (CreERT2)、ルシフェラーゼの配列を挿入した。正しく挿入が行われているかどうかは、PCR にて確認を行った。目的の変異が入った BAC を有している大腸菌は大量培養したのち、ラージコンストラクトプレップキット (Qiagen) にて BAC のみを精製し、受精卵にマイクロインジェクションにて導入した。その結果、BAC がマウスゲノムに挿入されたとみられる個体を得た (図 1)。

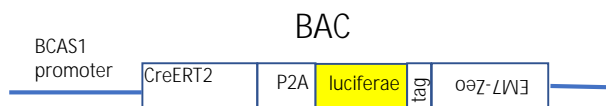


図1 BCAS1プロモーター制御下でCreリコンビナーゼとルシフェラーゼを発現するBACの模式図

(2) トランスジェニックマウスからの発光計測

得られたトランスジェニックマウスの候補は、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを腹腔内注射することで体内で発現しているはずであるルシフェラーゼと反応させ、発光を計測した。発光計測は浜松ホトニクス社のエクオリアを用い、麻酔をかけたマウスを案箱に入れ、フオンカウンターにて光を計測し、明視野画像と重ね合わせた。その結果トランスジェニックマウスの頭部から発光する様子が撮影された (図 2)。この結果は BCAS1 発現細胞であるオリゴデンドロサイトにルシフェラーゼが発現している可能性を強く示唆する。ところがこれらのトランスジェニックマウスの脳サンプルを用いて、抗ルシフェラーゼ抗体によるウエスタンブロットを試みるとルシフェラーゼのバンドが検出されなかった。脳スライスを用いた免疫染色でも、BCAS1 発現細胞でルシフェラーゼが発現している証拠が得られなかったことから、マウス脳から検出された発光の出どころが特定できないと判断し、このトランスジェニックマウスの実験での使用をあきらめた。

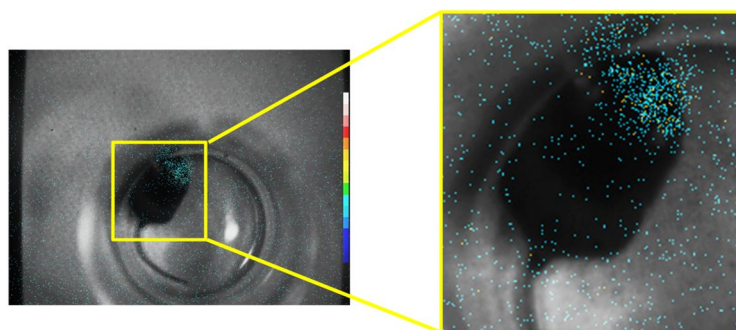


図2 トランスジェニックマウスからの発光計測
腹腔内にルシフェリンを注射し、マウスからの発光を計測した。
頭部からの発光が認められる。

これらの結果から、トランスジーンであるルシフェラーゼと Cre リコンビナーゼの発現が非常に少なかったため、検出感度の良い発光計測では光を検出できるものの、他の実験方法では検出感度が足りずに検出できない、という可能性が考えられた。この原因として考えられるのは、BAC のコンストラクトが、Cre リコンビナーゼ、ルシフェラーゼと複雑で長い配列を有していることである。そこで次にコンストラクトを単純にし、Cre リコンビナーゼのみが BCAS1 プロモーター制御下で発現するような BAC を作製し、トランスジェニックマウスを作製することとした (図 3)。



図3 BCAS1プロモーター制御下でCreリコンビナーゼを発現するBACの模式図

(3) コンストラクトを変更したトランスジェニックマウスの作製

Cre リコンビナーゼ (CreERT2) が BCAS1 プロモーター制御下で発現するマウスを作製した後は、Cre-loxp 反応依存的にルシフェラーゼが発現するアデノ随伴ウイルスをマウス脳に感染させることで、BCAS1 発現細胞にのみルシフェラーゼを発現させることができる。これによりアダルトミエリネーションを発光計測する計画である。また、ルシフェラーゼの代わりにジフテリアトキシンを発現するアデノ随伴ウイルスを用いれば、アダルトミエリネーションを起こしている細胞のみをこらすことができる。これによって脳機能にどのような影響が現れるか調べることができる。

実際の実験では、前回と同様に、BAC の配列を改変し、大腸菌内で増幅精製し、受精卵にマイクロインジェクションすることでトランスジェニックマウスを得た。今回は得られたトランスジェニックマウスを、Cre-loxp 反応依存的に蛍光蛋白質 tdTomato を発現するマウス (Ai9) と交配する。このマウスにタモキシフェンを注射することにより、CreERT2 を活性化させ、Cre-loxp 反応を誘導することで tdTomato の発現が誘導されるはずである。現在、交配作業を終え、BCAS1 発現細胞において tdTomato が発現しているかを確認する作業に移ろうとしている。

このように、当初の予定と比べて、実験の遂行が遅れているが、トランスジェニックマウスが目的通りに作製できたことが確認されれば、当初目的であるアダルトミエリネーションの観察解析を順次開始していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	和泉 宏謙 (Izumi Hironori) (00377342)	富山大学・医学部・技術専門職員 (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関