

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650195

研究課題名(和文)脳機能解析に最適なマルチタスク遺伝子制御法の開発

研究課題名(英文)A new multitasking gene specifically developed for the analysis of brain functions

研究代表者

崎村 建司 (Sakimura, Kenji)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：40162325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：コンディショナルノックアウトマウスを用いた脳機能解析においては、使用するCre等のドライバーマウスの発現時期や細胞種選択性が研究の質を決める要素となる。本研究の目的は、新規マルチタスクカセットを開発し、内在性遺伝子発現に影響を及ぼすことなく特定の細胞特異的にドライバー遺伝子を発現できるマウスを作製することである。このカセットは様々な機能を持ち、一度作出すると多目的に利用することが可能である。このことは、マウス作製にかかる労力、経費に対する効果が飛躍的に向上し、研究の効率化に寄与することができる。

研究成果の概要(英文)：In the analysis of brain functions using conditional knockout mice, the ability of Cre driver mice is important and determines the quality of research. The purpose of this study is to produce a new multitasking cassette which can express a specific gene in a cell-specific manner without affecting the endogenous gene expression. When a multitasking cassette is inserted into a specific driver gene, its driver gene is knocked out. Next, the stop sequences are removed, Cre can be activated under the corresponding promoter with the endogenous gene expression kept intact. Also, the corresponding gene expression can be rescued by the Flpase. After checking the function of this cassette in cultured cells, we next produced a knockin mouse with the cassette integrated in the Abat gene. The generated Abat-knockin mice and their Cre activity is being checked using the lacZ reporter mice. This system can contribute in generating driver mice with only one line, for the use of many purposes.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：神経科学・神経生理学・神経科学一般

キーワード：遺伝子 ノックアウトマウス Cre/loxP Flp/frt 脳機能解析

1. 研究開始当初の背景

我々は、C57BL/6 純系マウスでのコンディショナルノックアウト法が生命科学、特に神経科学領域において必須の研究基盤であると考え、C57BL/6N 系統 ES 細胞株 RENKA を樹立し、ターゲティングベクター構築の簡便化や相同組換え効率上昇法の開発などをおこない、多くの遺伝子改変マウスを作製してきた。Cre-loxP 組換え系やテトラサイクリン発現誘導系を用いたコンディショナルノックアウト法では、用いる Cre または tTA 等の発現マウス (ドライバーマウス) の発現時期、発現細胞種の特異性が研究の成否を決める。我々は、内在性遺伝子発現に近い発現パターンが最も安定して得られるという理由から、ノックイン法によりドライバーマウスを作製してきた。この方法では、ドライバー遺伝子を駆動させるプロモーター遺伝子の開始メチオニンの位置に挿入するために、当該遺伝子をノックアウトしてしまう。この駆動遺伝子のヘテロ欠損が表現型に影響を与えることもあり、標的遺伝子以外の遺伝子の発現変化は潜在的なデメリットとなる。我々はこの問題を克服するために、新規マルチタスクドライバーマウス開発を計画した。

単純なノックアウトマウスや floxed マウスなどは、既に大部分が国内外の豊富なりソースより入手可能であり、研究者レベルでの作製の必要性は徐々に低下してきている。しかしドライバーマウスについては個々の研究目的に応じたデザインが要求されるため、常に新規の系統を作製する必要がある。現在の発生工学的技術をもってしても遺伝子改変マウスを作製するための労力や経費は小さいものでは無いため、作製された 1 系統のマウスを、複数の目的に対して使用可能とする新ノックイン法によるマウスは、生命科学の推進に大きく貢献する事が期待される。

ドライバーマウスの主な作製法は、BAC トランスジェニック法とノックイン法に大別される。BAC トランスジェニック法は技術的にマウスの樹立が容易であることと、内在のドライバー遺伝子の発現に影響を与えないことが長所として挙げられるが、樹立した全ての系統が同じ発現パターンを示す訳ではないので系統ごとに発現を検証する必要がある。また、100-200kb 程度のゲノム成分を 1 コピー以上組み込むため、その領域に関してはゲノムの重複が生ずるが、その影響に関しては予測不能であることや、組み込まれた領域次第では予想外かつ検出困難な遺伝子発現の変動が起こりうることなどが短所として挙げられる。ノックイン法の長所と短所は BAC トランスジェニック法とほぼ逆の関係になるが、予想通りの発現パターンが比較的安定して得られるという理由に加え、行動

学的解析等、マウスの遺伝的背景に厳密性が要求される解析法の多い神経科学領域においては、その確実性ゆえにノックイン法がベターであると考えられてきた。

しかしノックイン法には大きな欠点がある。それは、必然的にドライバー遺伝子を駆動するプロモーター遺伝子をノックアウトしてしまうという点である。駆動遺伝子をノックアウトさせない方法として、近年、バイシストロニック性制御配列である 2A 配列に Cre 遺伝子を連結してドライバー遺伝子の停止コドン直前に挿入する、新たなノックイン法が開発された。しかし研究を進めるにあたり、実際的には駆動遺伝子自体の生理機能解析も重要であるケースは少なくなく、その場合は従来型のノックイン法の欠点 (ノックインマウス=ノックアウトマウス) はむしろ利点であった。以上のことから、作製した 1 系統のノックインマウスがドライバーマウスとして確実に利用できつつ、駆動遺伝子の発現についても制御可能となるシステムが求められていたが、近年まで信頼性の高いシステムは開発不可能だと思われていた。

2. 研究の目的

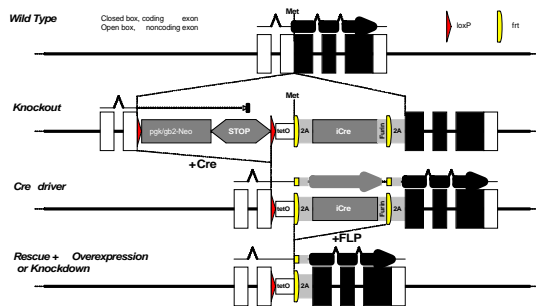
本研究の目的は、特定の遺伝子プロモーターを利用して、内在性遺伝子発現に影響を与えることなしにドライバー遺伝子の発現が可能であり、また異なった誘導方法でもドライバー遺伝子が制御でき、さらに、駆動プロモーター遺伝子の発現制御も可能にするマルチタスクカセットを開発し、特定の脳神経系の細胞にドライバー遺伝子を発現するマウスを作出することである。

本目的を達成するために、申請者等がすでに検証している前述の 2A 配列の利用と、FAST システム (Tanaka et al., Biol. Psychiatry 2010; 67: 770-773) の概念を適用することで信頼性の高い新たなノックイン法が開発できると考えた。2A 配列は、IRES 配列よりも確実にバイシストロニックな遺伝子発現を保証できることで、近年多くの研究に利用されている (Okita et al., Science 2008; 322: 949-953 など)。FAST システムは、一系統のノックインマウスから標的遺伝子の様々な発現制御を可能とする有用なシステムである。本研究においては、この 2 要素の特長を有機的に組み合わせることで、従来のドライバーマウス作製法の欠点を全て克服し、さらに駆動遺伝子の生理機能解析にも有用である新たなシステムの開発を目指す。

3. 研究の方法

全体の構想を iCre (改良型 Cre) 発現型ノックインマウスを例として記載する。tTA 等

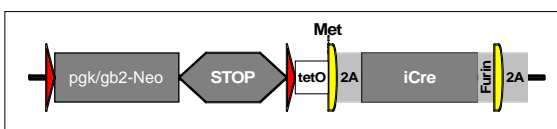
の発現型の場合でも基本的な構成は同じである。ドライバー遺伝子を駆動する遺伝子 (Wild type) へ、後述のカセットをノックインした最初の段階で、強力な STOP 配列によりドライバー遺伝子のノックアウトマウスとなる (Knockout)。別の Cre 発現マウスとの交配により、loxP 配列間のネオマイシン耐性遺伝子と STOP 配列を除去することで、Cre ドライバーマウスとなる (Cre driver)。この Cre の発現は tTS 等による制御も可能である。STOP 配列の除去後、FLP 発現マウスとの交配により frt 間の 2A-iCre-Furin が除去されることで、ほぼ野生型マウスと同じ状態 (Rescue) となるが、tetO 配列は残るため tTA, rtTA, tTS により駆動遺伝子の過剰発現 (Overexpression) またはノックダウン (Knockdown) が可能となる。また STOP カセットの除去以前に frt 間を除去した場合は、tTA, rtTA によって駆動遺伝子の異所性発現が可能となる。下記にその概念図を示す。



4. 研究成果

(1)汎用型 iCre ノックインカセットの構築

本研究では、まず対象とする駆動遺伝子の開始コドンの直後に、停止コドンが出現しないようフレームを合わせて frt 配列を挿入し、続けて 2A 配列と iCre 遺伝子を連結する。iCre 遺伝子には Furin 配列と frt-2A 配列を連結する。この frt-2A-iCre-Furin-frt-2A の挿入により、駆動遺伝子の発現を変化させずに iCre 遺伝子を発現させることが可能となる。さらに、駆動遺伝子の発現制御を可能とするために、FAST システムを一部改変して適用し、開始コドンの直前に loxP 配列、ネオマイシン耐性遺伝子、転写と翻訳を終結させるための STOP カセット、loxP 配列、tetO 配列を挿入する。このカセットの挿入により、下流の遺伝子のノックアウトと発現制御が可能となる。そこで、上記の構成要素を全て連結したノックイン用カセット (下図) を最初に構築した。なお、STOP 配列は、FAST シ

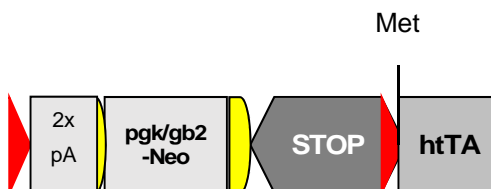


ステムの開発者である田中謙二准教授 (慶応大学) より分与された実績のあるものを使用した。また、これらのカセットを株化培養細胞に導入して作動確認をおこなった。

(2)次にノックインマウスを作製するためのターゲティングベクターの構築をおこなった。ベクター構築を容易にするため、Red/ET Recombination System を適用した。最初の駆動遺伝子の候補として、Abat 遺伝子を選択した。その理由は、当該遺伝子が、抑制性ニューロンに高い発現をする一方、その機能は明らかでないからである。抑制性神経細胞選択的なドライバーマウスとして利用する上でも好都合な遺伝子である。

ベクターは iCre と tTA をそれぞれ持つものを構築した。下図にヒト型コドンに修正した htTA カセットを示す。このカセットを前述の iCre カセットと同様に遺伝子に挿入する。これらのカセットを Abat 遺伝子の開始メチオニンのあるエクソン 2 の部分に挿入した。5' 側アームは 4.9 kb、3' 側アームは 6.0 kb のターゲティングベクターを構築した。次にこれらの構築したターゲティングベクターを C57BL/6N マウス胚性幹細胞 RENKA へ導入し、サザンプロットでスクリーニングをおこない、当該の組換えを起こしたクローンを選択した。これらクローンからキメラを作製し、各クローン由来のマウスを樹立した。Abat 遺伝子は、抑制性神経細胞に強く発現するが、脳神経系における機能的な重要性が明らかとなっていないものである。現時点でヘテロ K0 マウス同士の交配よりホモの K0 マウスが得られていないことから、Abat K0 マウスは致死である可能性が高く、この点についても引き続き解析を行っている。さらに、マウス生体内でマルチタスクカセットが予想通り機能し、駆動プロモーターから期待される細胞種選択的 iCre 発現マウスとなっていることと、Abat 遺伝子過剰発現マウス、Abat 遺伝子発現抑制マウスとなることを確認するため、レポーターマウスや細胞種選択的 tTA 発現マウス等との交配を進めている。

本研究で開発されたシステムを用いることで、一系統のマウスを多数の目的に利用できることから、マウス作製にかかる労力、経費に対する効果が飛躍的に向上することが期待され、これまで一長一短のあった従来法を選択せずドライバーマウスを作製できる意義は研究者にとって極めて大きい。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

Peng Fei、発達期小脳における顆粒細胞選択的かつ調節可能な組換え酵素 Cre 発現マウスの作製、分子生物学会 2013/12/5 兵庫県神戸市

中務胞、ラット ES 細胞から遺伝子改変動物作製の効率化、凍結胚を用いたキメラ胚作出法分子生物学会、2013/12/4 兵庫県 神戸市

I. WATANABE、Low affinity kainate receptors are involved with motor functions in mouse. Neuroscience2013 2013/11/12 アメリカ・サンディエゴ

L. ZHOU、Nna1 is related to motor learning, anxiety-related behaviors and dynamics of glutamate receptor subunits. Neuroscience2013 2013/11/11 アメリカ・サンディエゴ

渡辺和泉、カニン酸受容体サブユニット GluK2 ノックアウトマウスでは、運動障害がみられる Kainate receptor GluK2 subunit-deficient mouse shows motor dis coordination. 第 36 回日本神経科学大会/第 56 回日本神経化学会 NEURO2013 2013/6/20 京都府京都市

K.Sakimura, Quantitative analysis of kainite subunits and delta subunits of glutamate receptor in the mouse brain. I S N 24th Biennial Meeting 2013/4/22 メキシコ・カンクン

M.Abe, Systematic generation of conditional gene targeting mice developed using C57BL/6 ES cell line RENKA for analysis of brain functions. Neuroscience2012 2012/10/14 New Orleans(USA)

夏目里恵、C57BL/6 系統 ES 細胞 RENKA を用いた系統的遺伝子改変マウス作製法の効率、第 59 回日本実験動物学会総会 2012/5/25 大分県別府市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~cellular/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

崎村 建司 (SAKIMURA, Kenji)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号：4 0 1 6 2 3 2 5

(3)連携研究者

阿部 学 (ABE, Manabu)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号：1 0 3 3 4 6 7 4