

機関番号：63905

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700419

研究課題名 (和文) 多機能遺伝子改変マウスを用いたアストロサイトの機能解析

研究課題名 (英文) Analysis of astrocytic function by using STOP-tet0 system

研究代表者

田中 謙二 (TANAKA KENJI)

生理学研究所・分子生理研究系・助教

研究者番号：30329700

研究成果の概要 (和文)：多機能遺伝子改変技術を用いて、ヒト小児神経疾患 MLC のモデルマウスを樹立した。ヒトでは MLC1 遺伝子の変異によって生じる病態が、マウスにおいては遺伝子喪失ではなく過剰発現によってモデル出来ることが分かった。モデルマウスの解析から、MLC はその機能亢進によってアストロサイトの膨化および髄鞘内の空胞に至ることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：I succeeded to establish the animal model for a white matter disease named megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC), which is caused by MLC1 mutation. I used a versatile new gene modulation system to generate both mouse Mlc1 gene conditional knockout and overexpression. I found that Mlc1 was exclusively expressed by astrocytes and its overexpression resulted in astrocytic swelling and vacuolating myelopathy, whereas Mlc1 gene knockout mice were grossly normal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：グリア細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、MLC

## 1. 研究開始当初の背景

アストロサイトの機能には不明な点が多い。アストロサイトの新たな機能を発見する一つの方法に、アストロサイト特異的疾患の病態生理解析から帰納的に機能に迫る方法がある。小児神経疾患 Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (以下 MLC) はアストロサイト特異的に発現する遺

伝子 MLC1 の変異によって脳白質に障害が起こるので、この疾患の解析からアストロサイトがどのようにして脳白質の恒常性を維持しているか知ることが出来る。MLC モデル動物の報告が無いので詳細な病態生理がわからないままであった。

MLC モデルマウスの作成として、これまで報告されている Mlc1 変異体をマウスでアストロサイトに発現させる手法が可能である。しか

し、これまで20近くの変異体が報告されており、複数報告される変異体による疾患重症度も異なっていたため、どの変異体を用いた遺伝子改変マウスを作成すべきか分からない状態であった。

一方で、MLCのようなメンデル則に従う遺伝子疾患は、遺伝子ノックアウトか遺伝子過剰発現のどちらかがモデル動物になることが経験的に分かっていた。すなわち、20の変異体をそれぞれ別個に作成するよりは、ノックアウトと過剰発現を2つ作成する方が、モデル動物作成の戦略として妥当であると研究開始当初は考えられた。

## 2. 研究の目的

MLCモデルマウスを樹立する。その目的のために、遺伝子ノックアウトマウスと過剰発現マウスを作成するが、その作成にかかわる時間を最小限にできるシステム、多機能遺伝子改変システムを用いる。

ついでそれぞれのマウスの組織学的解析を行い、どちらの遺伝子操作がMLCの病態を模倣しているか調べる。

Mlc1遺伝子操作によって、なぜ脳白質に形態異常が起こるのか、その分子メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 多機能遺伝子改変をマウス Mlc1 遺伝子に施し、時期特異的な遺伝子制御が可能なマウスを樹立する。具体的には、Mlc1 遺伝子ノックアウト (図1) と、Mlc1 遺伝子をアストロサイトだけで過剰発現させる Mlc1 遺伝子過剰発現マウス (図2) を作成する。

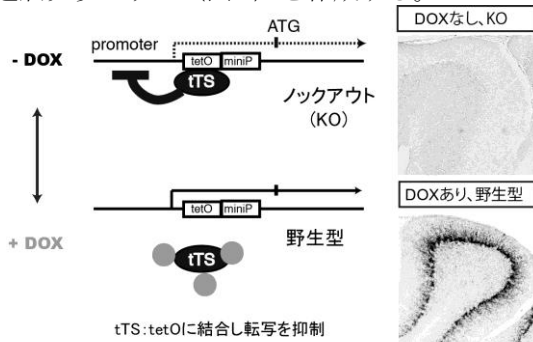


図1 時期特異的Mlc1ノックアウト

(2) 時期特異的 Mlc1 発現喪失実験と過剰発現実験から得られるマウスの脳白質を組織学的に解析し、表現型を明らかにする。

(3) Mlc1 分子と相互作用する新規分子を探索し、その新規分子を介した病態発生への可能性をさぐる。

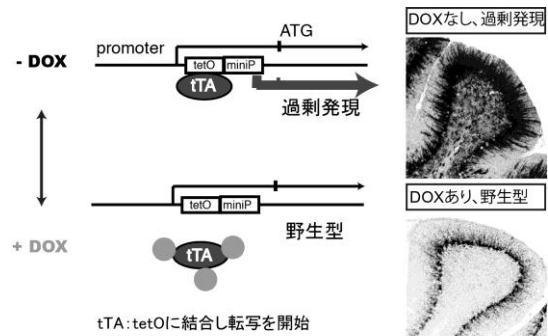


図2 アストロサイト特異的Mlc1過剰発現

## 4. 研究成果

(1) 多機能遺伝子改変システムを用い、まず Mlc1 STOP-tet0 ノックインマウスを作成した。次いで、ROSA-Flpe マウスと交配させることによって STOP カセットを除去し、Mlc1 tet0 ノックインマウスを作成した。

Mlc1-tTA マウスは、マウス Mlc1 遺伝子に tTA を挿入した改変 BAC クローンを用い、BAC トランスジェニックマウスとして作成した。独立した 3 ラインを得ることが出来たが、そのうち 95%以上のアストロサイトで tTA を発現するライン 1 つを選別し、それ以降の実験に用いた。

Actin-tTS::Mlc1 tet0 ノックインマウスの組み合わせでドキシサイクリン依存的な遺伝子ノックアウトが樹立できた。Mlc1-tTA::Mlc1 tet0 ノックインマウスの組み合わせで過剰発現マウスが樹立できた。特に、アストロサイトだけで Mlc1 が過剰発現しているかどうか、アストロサイトマーカーである GFAP と共染色し、その特異性を確認したところ、GFAP 陽性アストロサイトだけに Mlc1 mRNA が誘導されていることが明らかになった (図3)。

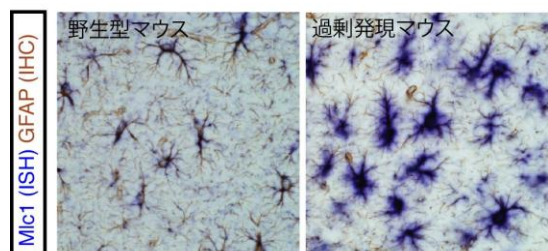


図3 アストロサイトでMlc1が過剰発現する

(2) Mlc1 単純ノックアウト、髄鞘形成後からノックアウトのいずれも脳白質の組織学的な変化は認められなかった。一方で、Mlc1 過剰発現マウスでは、脳白質である脳梁 (次ページ図4 上段) や髄鞘化軸索に富む淡蒼球 (図4 下段) に空胞が多数見られた。

電子顕微鏡観察によって、これらの空胞のうち半分はアストロサイトの膨化によるもので、残りの半分は髄鞘化軸索のミエリンと軸索間に生じた空胞であることが分かった。

## 野生型

## 過剰発現

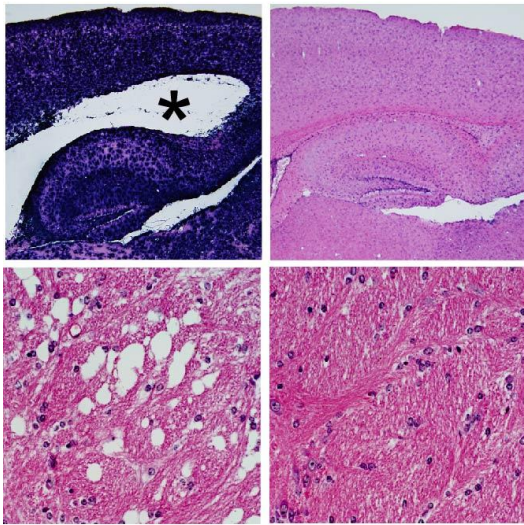


図4 Mlc1過剰発現で見られる空胞

(上段) 脳梁に巨大な空胞 (\*)が形成される  
(下段) 淡蒼球に観察される微小な空胞

以上の組織学的変化はヒト MLC で報告されている病理と酷似することから、ヒト MLC は MLC1 遺伝子の機能亢進によって起こることが示唆された。一方でヒト MLC は MLC1 遺伝子の喪失によって起こる疾患ではないことが示唆された。これまでヒト MLC の原因遺伝子検索として、MLC1 遺伝子に変異があるかどうかだけ調べられてきた。その結果、20 以上の変異が報告されてきた。しかし、本研究結果によれば、変異を検索するだけでなく、遺伝子のコピー数が増えているか、次世代シーケンサーなどを用いて検索する妥当性が出てきた。特に、MLC と同様の症状をきたすが、変異が見つけられないケースにコピー数の定量を行う根拠を本研究が提示できたといえる。

(3) Mlc1 遺伝子は膜タンパク質であり機能がわかっていなかった。Mlc1 遺伝子の構造がカリウムチャンネルに類似するという報告を受け、Mlc1 に何らかのチャンネル活性があるかどうか調べた。残念ながら、Mlc1 を発現させたことによって、いかなる有意な電流変化を見ることが出来なかった。

次に、Mlc1 分子と相互作用する分子を同定することを目的として、Mlc1 分子の免疫沈降を試みた。市販の Mlc1 抗体、国外の研究者が自作した Mlc1 抗体を用いて免疫沈降を試みたが、いずれの抗体も免疫沈降が出来ない抗体であった。そのため、マウス Mlc1 分子のペプチドを抗原としてウサギ抗体を作出した。

Mlc1 ノックアウトマウスの脳サンプルを用い、新規 Mlc1 抗体の良好な特異性を確認した。新規 Mlc1 抗体で培養アストロサイトの免疫細胞染色、脳切片の免疫組織染色を行ったと

ころ、Mlc1 分子は細胞膜よりはむしろゴルジ体や粗面小胞体などの細胞内膜に多く分布する分子であることが分かった。Mlc1 ノックアウトマウスの脳を陰性コントロールとして Mlc1 免疫沈降を行い、沈降物を泳動したところ、複数のバンドが検出された。今後は得られた分子の質量分析を行うことによって、Mlc1 分子と相互作用する分子を同定し、その分子の機能異常で MLC の病態が説明できるかどうか研究を進展させていく。

(4) 副次的な結果として、Mlc1 過剰発現マウスにおける小脳細胞構築異常を発見した。小脳の Mlc1 発現細胞はバグマングリアであることから、小脳発達期のバグマングリアにおけるなんらかの異常が小脳構築異常を引き起こしていると考えられる。バグマングリアがどのようにして整然とした神経細胞の配置に関与するのか調べる良いモデルとなる。

### 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 1 件)

Tanaka KF, Ahmari SE, Leonardo ED, Richardson-Jones JW, Budreck EC, Scheiffele P, Sugio S, Inamura N, Ikenaka K, Hen R. (2010) Flexible Accelerated STOP Tetracycline Operator-Knockin (FAST): A Versatile and Efficient New Gene Modulating System. *Biol Psychiatry*. 15:67(8):770-773

(査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

①Kenji F. Tanaka (2010. 10. 19) A versatile new gene modulating system and its application in glial biology. The 10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry (Phuket) (シンポジウム)

②杉尾翔太、田中謙二、渡辺雅彦、池中一裕 (2010. 09. 02) 小脳発達におけるバグマングリアの役割. *Neuro2010* 第53回日本神経化学会(神戸)大会・第33回日本神経科学大会・第20回日本神経回路学会大会 合同大会 (神戸) (ポスター)

③Shouta Sugio, Kenji F. Tanaka, Masahiko Watanabe & Kazuhiro Ikenaka (2010. 5. 29) The role of Bergmann glia in cerebellar

development. 第74回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム (名古屋)

④Kenji F. Tanaka, Rene Hen, Kazuhiro Ikenaka (2009.8.28) A versatile new gene modulation system and its application in glial biology. The 22nd Biennial Meeting of the ISN/APSN Joint Meeting (Pusan, Korea)

[その他]

ホームページ等

生理学研究所の広報展開推進室より研究成果をホームページへ掲載

<http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2010/03/fast.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 謙二 (TANAKA, KENJI)

生理学研究所・分子生理研究系・助教

研究者番号：30329700