

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目

Characterization and application of mice expressing Cre recombinase

Cre 組換え酵素を発現するマウスの解析と応用

指導教官 三品昌美教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月進学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 布施俊光

Rho, Rac, Cdc42 を代表とする Rho ファミリーはアクチン細胞骨格系の再編成に関与していることが明らかになっている。RhoA は Rho ファミリーに属す低分子量 G タンパク質であり、その機能は細胞の形態や凝集、運動、細胞質分裂、増殖、ストレスファイバーの形成、エキソサイトーシスなど多岐にわたっている。これらの RhoA の機能は、培養細胞系においてはよく解析されているが、生体内における役割はいまだによくわかっていない。そこで私は、生体内での RhoA タンパク質の役割を調べるため、Cre/loxP 遺伝子組換えシステムを用いて誘導可能な恒常活性型 RhoA (caRhoA) 発現トランスジェニックマウスを作成した。ここでは、そのマウスを応用して初期発生の分子機構の解析をおこなった。

大腸菌ファージ P1 由来の Cre 組換え酵素は、loxP と呼ばれる 34 塩基の配列を特異的に認識し、二つの loxP 配列間で遺伝子組換えをおこなす。この Cre/loxP システムを、標的遺伝子である caRhoA を Cre 活性依存的に過剰発現させるために用いた。Chick β -actin のプロモータを改変して作られた CAG プ

ロモータの下流に、二つの loxP で挟まれた lacZ 遺伝子、次に caRhoA 遺伝子を接続した組換え遺伝子ベクター CAG-Z-caRhoA を作成し、C57BL/6 を遺伝的背景に持つマウス受精卵に注入することで、遺伝子組換えマウス 5 系統を得た。この 5 系統の中から、CAG プロモータが成熟脳で強く活性化し、Cre 依存的に caRhoA が発現することが期待される形の組換え遺伝子を保持する Rho36 マウスラインを樹立した。この Rho36 マウスを Cre 発現マウスと交配することにより、Cre が活性化した細胞で lacZ 遺伝子が欠失し、強力な CAG プロモータにより caRhoA が過剰発現することが実現する。また、Rho36 マウスラインにおいては胎生期の胚盤胞より CAG プロモータが活性化していることが X-gal 染色により明らかになり、適切な Cre 発現マウスを選択することで、成熟脳細胞のみならず初期胚から caRhoA 発現の解析が可能であることがわかった。

次に、Rho36 マウスラインと交配させる Cre 発現マウスとして、TLCN-Cre マウスの Cre 組換え酵素の機能発現部位・時期の解析をおこなった。TLCN-Cre マウスは、生後、終脳特異的に発現する免疫グロブリン様接着分子である Telencephalin 遺伝子の翻訳開始メチオニンコドン直下に、遺伝子相同組換えによって Cre 遺伝子を導入したマウスである。このマウスを Cre 活性のレポーターマウスである CAG-CAT-Z マウスと交配し、X-gal 染色をすることで Cre 活性化部位を観察した。得られた生後 28 日齢マウスにおいて終脳のみならず脳全域で β -galactosidase 活性が認められ、Cre による組換えは Telencephalin の発現領域に限局されていなかった。また、新生仔マウスの全身の 11 の組織よりゲノム DNA を抽出し、組換えをサザンハイブリダイゼーションにより観察したところ、組換えが全身でほぼ均一な効率でおこなわれていることがわかった。これは発生の早い時期での Cre 活性化によるものと考えられることから、胎生期における組換えを X-gal 染色で観察した。その結果、胎生 3.5 日齢 (dpc) においては活性化しておらず、着床後の 5.5 dpc においては β -galactosidase 活性が認められ、発生初期の Cre 活性化が明らかになった。

この TLCN-Cre マウスを Rho36 マウスと交配することで、胎生期における caRhoA の過剰発現の効果、ひいては Rho36 マウスに導入された組換え遺伝子が機能することを示すことができると考え、解析をおこなった。まず、TLCN-Cre ホモ接合体と Rho36 ヘテロ接合体の交配により得られた新生仔マウスの遺伝型を調べたところ、Rho36/TLCN-Cre の両ヘテロ接合体マウスは出現せず、胎生致死であることが明らかになった。次に子宮より胚を採取して胎生期発達障害の観察をおこなった。まず、TLCN-Cre による CAG-Z-caRhoA 遺伝子の組換えが胚で起きていることを 9.5 dpc 胚ゲノムにおける Cre による

loxP 間欠失をサザンハイブリダイゼーションで確認した。得られた胎仔の外見の大まかな形態観察では、7.5 dpc 胚までは発達に大きな差は観察されなかったが、8.5 日胚では Rho36/TLCN-Cre 変異胚において発達の抑制、headfold といった形態形成の不全が観察された。このことから、着床後の 7.5 – 8.5 dpc の間に発生障害が現れることが示唆された。

さらに胚薄切切片のヘマトキシリン・イオシン染色による組織学的な観察により、発生障害の原因の解析をおこなった。7.5 dpc 変異胚では、羊膜腔における外胚葉原基細胞の異常な増殖により細胞塊の隆起が観察された。またこの時期の正常胚で観察される中胚葉形成や、胚外部組織の形成は、変異胚においても若干の乱れはあるもののきちんと起きている。原始線条の形成を観察するために、原始線条マーカー遺伝子である *T* 遺伝子のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなったところ、変異胚と正常胚の間で差は観察されなかった。これらのことから、caRhoA の発現は外胚葉原基細胞の異常増殖をおこし、原始線条に移動して中胚葉形成に移行しなかったものの一部が羊膜腔に蓄積して隆起を形成するものと考えられる。外胚葉原基において表現系が観察されたのは、もともと増殖能が高い外胚葉原基細胞において caRhoA が発現することでさらに増殖能が高まったためと考えられる。

この研究において、caRhoA を Cre 依存的に発現するマウスを作成し、TLCN-Cre マウスと交配することで、着床後マウス初期胚における caRhoA の発現の初期発生に与える影響を観察することができた。マウス初期胚における caRhoA の過剰発現が発生の正常な進行を阻害し、それは外胚葉原基細胞の増殖の亢進によると思われる。また、導入された CAG-Z-caRhoA 組換え遺伝子が機能すること、そこから発現する caRhoA が生理的な作用を顕わすのに十分な量であることが示された。Cre 依存的 caRhoA 発現マウスが確立したことから、他の時期・組織特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウスと交配することで、それらの組織での caRhoA の機能の解析もおこなうことも可能となった。脳の高次機能発現過程において、神経細胞の形態変化が学習・記憶の形成といった神経活動にともなっておこっていることが指摘されている。特に、学習・記憶の電気生理学的な素過程とされるシナプス可塑性の発現時にスパインの形態変化がおこり、それは NMDA 受容体依存的であることが示されている。さらに NMDA 受容体依存的な形態変化はシナプス形成時にも観察され、NMDA 型受容体特異的アンタゴニストを作用させた際の樹状突起伸長の抑制が、低分子量 G タンパク質 RhoA のドミナントネガティブ体により解除されることが報告されている。これらのことから、NMDA 受容体を介して RhoA にいたる、神経伝達に制御された神経細胞骨格再編成の存在が示唆された。今後、神経細

胞特異的な Cre 発現マウスと交配することで, 脳の高次機能における RhoA 情報伝達の役割も明らかにできると思われる.

また, 今回の解析で, マウス初期発生の解析において Cre/loxP 遺伝子組換えシステムを応用する実験系が有効であることも示すことができた. 胎生期に外来遺伝子を発現させて発生への影響を観察する場合, 通常 of 組換え遺伝子導入では, 導入した遺伝子が致死性を示す場合にはマウスの系統の維持が困難である. そのような問題をこの解析系は回避できることから, 初期胚の発生上における遺伝子機能の解析に TLCN-Cre は非常に有効であると考えられる.