

論文の内容の要旨

論文題目 Generation and Analyses of Purkinje Cell-Specific
TrkB Knockout Mice

和訳 小脳プルキニエ細胞特異的 TrkB ノックアウトマウス
の作成およびその解析

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 10 年 4 月 入学

医学博士課程
機能生物学専攻

氏名 岩野 はるか

神経栄養因子およびその受容体は、神経細胞の生存・維持、神経回路網形成、シナプス可塑性、記憶・学習に重要な分子として注目を集めている。なかでも神経栄養因子受容体に属する TrkB は脳由来神経栄養因子 (BDNF) および Neurotrophin-4 (NT-4) に対する高親和性受容体として、TrkC は Neurotrophin-3 (NT-3) に対する高親和性受容体として、中枢神経系において広範囲な発現を示し、神経細胞の生存維持に協調して関わっていることが明らかになっている。しかし、TrkB および TrkC のノックアウトマウスは出生後致死的であるため成体における十分な解析が行われていなかった。そこで本研究では、脳部位特異的コンディショナルノックアウトマウスを作成し、TrkB および TrkC の機能解析を行うことにした。

本研究ではまず、ターゲットマウスの作成を行った。始めに、TrkB、TrkC チロシンキナーゼドメインを含んだゲノム遺伝子をクローニングし、次に TrkB の 3 番目のキナーゼドメインをコードするエキソン (K3) の両端、あるいは、TrkC K2 エキシソンの両端に Cre の認識配列 loxP を挿入したターゲティングベ

クターを作成した。このターゲティングベクターには、ES 細胞での選択を目的としてネオマイシン耐性遺伝子 Neo を挿入した。また、挿入した Neo が従来の遺伝子発現に影響を及ぼす可能性を除去するため、Neo の両端には Flp Recombinase Target (FRT) 配列を付加し、この配列を認識する遺伝子組み換え酵素 Flp による Neo の除去を可能にした。

この様にして作成したターゲティングベクターは、C57BL/6 由来の ES 細胞にエレクトロポレーションにより遺伝子導入した。続いて、相同組み換えによりターゲティングベクター由来遺伝子が組み込まれた ES 細胞をサザンハイブリダイゼーションを用いてスクリーニングした。スクリーニングの結果、得られた相同組み換え ES 細胞は TrkB で 435 クローン中 29 クローン、TrkC で 238 クローン中 4 クローンであった。インジェクションには、TrkB で 5 クローン、TrkC で 4 クローンの ES 細胞を用いた。この ES 細胞を ICR 由来の 8 細胞期胚にマイクロインジェクションした後、胚盤胞期に、仮親の子宮内に移植した。このようにして、TrkB では雄の 100% キメラマウス 1 匹を、TrkC では 100% および 90% のキメラマウス 2 匹を得ることができた。得られたキメラマウスは、交配により、ES 細胞由来の相同組み換え遺伝子が生殖系列を通して子孫マウスへ伝達することを確認した。

このように、本研究では C57BL/6 由来の ES 細胞を用いることにより、戻し交配を行わずに C57BL/6 の遺伝背景が 100% であるターゲットマウスを作成することができた。従来、遺伝子ノックアウトに使用されてきた ES 細胞は 129 マウス由来であったが、この 129 系統マウスにおいては脳梁の形成不全が報告されており、また、空間学習や運動学習といった行動解析に影響を与えるマウスの遺伝背景が問題となってきた。こういった点から、本研究で用いた C57BL/6 由来 ES 細胞は、中枢神経系での機能解析を目的とした遺伝子ターゲティングにおいて重要なツールとなると考えられた。

次に、ターゲット遺伝子中の Neo を除去することを目的として、FLP を持つ C57BL/6 由来トランスジェニックマウスとターゲットマウスとを交配した。こうして得られた $\text{TrkB}^{\text{floxed}}/\text{FLP}$ マウスは C57BL/6 マウスと交配し、TrkB ターゲット遺伝子を持ち、FLP 遺伝子を持たない子孫マウス 54 匹を得た。これらのうち TrkB ターゲット遺伝子から Neo が欠失しているマウス 20 匹をサザンハイブリダイゼーションにより選択した。このようにして得たマウス ($\text{TrkB}^{\text{lox/+}}$) を後の Cre マウスとの交配に用いた。TrkC ターゲットマウスも同

様に交配して作成した。

一方、作成したターゲットマウスにおいて、実際に Cre の存在下で loxP 間が欠失することを確認するために、全身で Cre を発現するノックインマウス TLCNCCre と TrkB ターゲットマウスとを交配した。この子孫マウスを用いたサザンハイブリダイゼーションにより、実際に TLCNCCre の存在下で K3 領域が欠失し、ヘテロの遺伝子型 (TrkB^{+/−}) を示すことを確認した。続いて、K3 領域の欠失によりタンパクレベルで TrkB が消失することを確認するために、TrkB^{+/−} マウスを交配し、TrkB null ノックアウトマウス (TrkB^{−/−}) を作成した。TrkB^{+/−} マウスは、これまでの知見と同様、生後 48 時間以内に死亡した。生後 0 日の時点で全脳を用いたウエスタンブロット法により、TrkB^{+/−} マウスにおいて実際に TrkB 蛋白質が消失していることを確認した。これらの結果から、作成した TrkB ターゲットマウスは期待通り、Cre の発現下で TrkB を欠損することが確認できた。

Cre マウスには、海馬 CA3 領域錐体細胞特異的発現を示す GluRγ1 受容体の開始コドン部位に Cre 遺伝子を挿入したノックインタイプの GluRγ1 Cre マウス、および、プルキニエ細胞と網膜双極細胞に特異的発現を示す分子である L7 の開始コドン部位に Cre 遺伝子を挿入した L7Cre マウスを用いた。まず、L7Cre マウスと TrkB^{fllox/+} マウスとを交配することにより、ターゲット遺伝子と Cre 遺伝子をヘテロに持つ TrkB^{fllox/+}・L7^{Cre/+} マウスを作成した。さらに、TrkB^{fllox/+}・L7^{Cre/+} と TrkB^{fllox/+} とを交配することにより、TrkB ターゲット遺伝子をホモに、Cre 遺伝子をヘテロに持ち (TrkB^{fllox/fllox}・L7^{Cre/+})、プルキニエ細胞特異的に TrkB を欠失するマウス (TrkB^{PuKO}) を作成した。TrkB を海馬 CA3 領域特異的に欠失するマウス (TrkB^{CA3KO}) 作成の交配も同様に行った。

TrkB^{PuKO} マウスは正常に発育・繁殖した。TrkB^{PuKO} における遺伝子ノックアウトの開始時期を調べることを目的として、小脳全体のゲノムを用い、PCR による解析を行った。この結果、TrkB^{PuKO} マウスにおいて、生後 0 日の時点で TrkB の遺伝子欠損に由来するバンドを検出することができた。しかし、TrkB^{PuKO} マウスを用いた組織学的解析および小脳が関わりと考えられている行動解析 (rotorod、瞬目反射条件付け学習) において、TrkB^{PuKO} マウスとコントロールマウスとの間に有意差は認められなかった。このように、TrkB^{PuKO} が小脳の形態学的・行動学的解析において正常な表現型を示したことは、プルキニエ細胞に発現する TrkB が、小脳の形態形成や小脳が関与する

学習行動に重要ではない、という可能性を示唆した。BDNF や TrkB の全身での全身でのノックアウトマウスではプルキニエ細胞の形態異常と共に外顆粒層から内顆粒層への顆粒細胞の移動障害が報告されているが、これらの異常は、プルキニエ細胞に発現する TrkB ではなく、顆粒細胞といった、プルキニエ以外の細胞に発現する TrkB が欠失したことが原因であったと考えることが可能である。

以上、TrkB、TrkC コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析は、末梢・中枢神経系に広範囲に発現する TrkB、TrkC の特定部位における機能を解析することを可能とした。このような、コンディショナルノックアウト法を用いた研究は、中枢神経系における特定脳部位の機能を調べる上で今後有用であると考えられた。