

審査の結果の要旨

氏名 岩野 はるか

本研究は、神経回路網形成や記憶・学習に重要と考えられる神経栄養因子受容体 TrkB および TrkC の機能を明らかにするため、これらの分子の部位特異的ノックアウトマウスを作成・解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. TrkB および TrkC チロシンキナーゼドメインを含むゲノム遺伝子をクローニングし、キナーゼドメインをコードするエキソンの両端に遺伝子組み換え酵素 Cre の認識配列 loxP を挿入した TrkB および TrkC ターゲティングベクターを作成した。TrkB および TrkC ターゲティングベクターは C57BL/6 由来の ES 細胞に遺伝子導入し、相同組み換え ES 細胞を得た。相同組み換え ES 細胞を ICR 由来 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へ移植し、TrkB および TrkC キメラマウスを得た。キメラマウスの子孫においてターゲット遺伝子が生殖系列を通して伝達することを確認し、C57BL/6 の遺伝背景が 100% である TrkB あるいは TrkC ターゲットマウスを得た。
2. 実際にターゲットマウスにおいて Cre 存在下で loxP 間が除去されることを確認するため、TrkB ターゲットマウスと Cre を全身で発現する TLCNCre マウスとを交配した。子孫マウスを用いた Southern blot hybridization により、loxP 間が欠失し、ヘテロの遺伝子型になっていることが示された。さらに、ヘテロマウス同士を交配し、TrkB null マウスを作成した。Null マウスは生後 48 時間以内に死亡した。生後 0 日目 (P0) の全脳を用いたウエスタンブロット法により、期待通り null マウスでは TrkB タンパク質が欠失していることが示された。
3. ES 細胞での選択を目的としてターゲット遺伝子に挿入した薬剤耐性遺伝子 Neo を除去するために、TrkB ターゲットマウスと遺伝子組み換え酵素 FLP を生殖細胞で発現する FLP66 トランスジェニックマウスとを交配した。そ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、FLP

Recombinase Target (FRT) 間の遺伝子組み換えが起り Neo が除かれていることが示された。

4. 海馬 CA3 錐体細胞特異的 TrkB ノックアウトマウスを作成するために、海馬において CA3 錐体細胞特異的発現を示す GluR1Cre マウスと TrkB ターゲットマウスとを交配した。子孫マウスの P28 の全脳を用いた *In Situ Hybridization* により、実際に TrkB mRNA が海馬 CA3 において低下していることが示された。
5. 小脳プルキニエ細胞特異的 TrkB ノックアウトマウスを作成するために、プルキニエ細胞および網膜双極細胞特異的に Cre を発現する L7Cre マウスと TrkB ターゲットマウスとを交配した。子孫マウスの小脳ゲノムを用いた PCR により P0 よりも早い時点で、TrkB の遺伝子ノックアウトが開始していることが示された。
6. プルキニエ細胞特異的 TrkB ノックアウトマウスを用いた組織学的・行動学的解析ではコントロールマウスと比較し、異常は認められなかった。このことは、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。TrkB null mouse で報告されているプルキニエ細胞樹状突起の発達阻害や顆粒細胞移動阻害はプルキニエ細胞以外の部位に発現する TrkB が関与していると推測された。

以上、本論文は C57BL/6 由来 ES 細胞を用いた遺伝子ターゲティングシステムを確立し、C57BL/6 の遺伝背景が 100% である TrkB および TrkC ターゲットマウスを得た。このシステムは、従来の 129 由来 ES 細胞を用いた遺伝子ターゲティングシステムで問題となってきた遺伝背景の問題点を克服したものである。また、海馬 CA3 特異的あるいはプルキニエ細胞特異的 TrkB ノックアウトマウスは、広範囲な発現を示す TrkB の特定脳部位における機能解析、さらにプレシナプスあるいはポストシナプスにおける機能を明瞭に区別して解析することを可能とした。本研究で確立した手法は、中枢神経ネットワークの機構の解明に重要なツールとなると考えられ、学位の授与に値すると考えられる。