

# 中枢神経系におけるコンディショナル遺伝子ノックアウト

鈴木 昇 二木 啓

## 1. [はじめに]

コンディショナル遺伝子ノックアウトは、遺伝子改変動物（ミュータント動物）の特定の臓器・細胞型においてのみ研究対象の遺伝子機能を欠損させる技法である（図1B）。近年、その必要性・重要性がますます高まっている。

なぜ、コンディショナル遺伝子ノックアウトが必要なのか。従来の遺伝子ノックアウトでは、ミュータント動物の初期発生時期から成体にいたるまで、からだを構成するすべての細胞で対象遺伝子の機能が欠損する。そのため、つぎのような場合、中枢神経系における対象遺伝子の機能解析が困難または不可能となるからである。

第一例として、対象遺伝子産物が、成体の中枢神経系における機能以外に、胎生期の動物の正常発育に重要な機能を持つ場合である。従来法では、遺伝子ノックアウトによって母体内で重篤な奇形や胚性致死が誘発されるため、成体における機能解析が困難であるか、ミュータント動物を得ることすらできない。

第二例として、対象遺伝子産物が、動物成体において、中枢神経系における機能以外に他の臓器で重要な機能を担っている場合である。従来法では、ミュータント動物の表現型（症状）は複数臓器の異常の複合結果となってしまうため、直接の原因臓器を特定することが困難である。

第三例として、対象遺伝子産物が中枢神経系特異的ではあっても、複数種の細胞型で発現・機能している場合である。従来法では、症状を特定のタイプの細胞の機能異常に帰着することは容易ではない。

われわれは、中枢神経系に限定してカルシウム動態を制御する遺伝子群の生理機能を解析するため、以上の従来の遺伝子ノックアウトの短所を解決する糸口を求めコンディショナル遺伝子ノックアウトの系の確立を指向してきた。

## 2. [研究内容：cre マウスと flox マウスの開発]

コンディショナル遺伝子ノックアウトは、バクテリオファージ P1 由来の Cre たんぱくが、哺乳類の細胞核内においても染色体 DNA に組み込まれた 3 4 塩基対の loxP 配列を認識して組換えを起こす現象を応用した技法である。（図 1 A）

したがって、中枢神経系においてコンディショナル遺伝子ノックアウトをするためには、中枢神経系の細胞にのみ Cre たんぱくを発現するトランスジェニック動物（cre マウスと総称）と対象遺伝子（またはその機能ドメインをコードするエクソン）を loxP 配列ではさん

だ遺伝子を持つマウス (floxed マウスと総称) の開発が必要である。

われわれは、cre マウス作製にあたりトランスジーンのプロモーターとして、神経細胞特異的プロモーターとして前脳 (特に海馬) カルモデュリンキナーゼ II アルファサブユニット (CAMKII  $\alpha$ ) 遺伝子と小脳プルキンエ細胞・網膜双極細胞特異的 L7 遺伝子、神経細胞ではないが神経系を構成する重要な構成員であるグリア細胞に特異的なグリア線維酸性たんぱく質 (GFAP) 遺伝子、計三種類の遺伝子プロモーターを採用し、それぞれのタイプの細胞に特異的に cre たんぱくを発現する 3 系統のマウスの作製を試みた。(図 2 A,B,C)

floxed マウスとして、電位依存性カルシウムチャンネル A のアルファ 1 サブユニット遺伝子を標的とした。遺伝子ターゲティング法によって翻訳開始点を含む第一エクソンを loxP 配列ではさみこんだマウスの作製を試みた。また、cre マウスにおける cre たんぱくの発現部位の特異性を機能的に確認するために、組換え後に細胞内に大腸菌ベータガラクトシダーゼたんぱくを発現・蓄積する機能を有するトランスジーン (LacZ テスターと呼称) を持つマウスの作製を試みた。(図 2 D)

もっとも解析の進んでいる CAMKII  $\alpha$ -cre-20 マウスの例を示す (図 3)。CAMKII  $\alpha$ -cre-20 マウスと LacZ テスターマウスを交配して、誕生直後の動物を得た。氷上にて安楽死させた後、4%パラホルムアルデヒドで固定・矢状断した標本作製し、LacZ 染色をおこなった。CAMKII  $\alpha$ -creトランスジーンと LacZ テスターの両方の遺伝子を受け継いだ個体でのみ、中枢神経系の細胞群で特異的に濃紺のベータガラクトシダーゼ陽性の結果を得た。これは、この個体で、cre たんぱくが中枢神経細胞特異的に発現・機能しており、LacZ テスター遺伝子とその細胞群でのみ特異的に組換えを起こしたことを示している。

### 3. [まとめ]

中枢神経系に限定してカルシウム動態を制御する遺伝子群の生理機能を解析するためのモデル動物系の確立を目指してきた。その結果、中枢神経系で特異的に (コンディショナルに) 遺伝子機能を欠損しうるマウスの作製に成功した。

### 4. [最後に]

ヒトゲノム計画によって、約 10 万個の遺伝子配列が明らかにされようとしている。その中には、生命活動におけるカルシウム動態を制御する遺伝子のすべてが含まれているはずである。次のステップの重要課題に、個々の遺伝子について遺伝子改変動物を作製すること、それを素材として分子から個体まで総合的に個々の遺伝子の機能を解析することが挙げられる。その意味で、われわれが開発に成功した Cre マウスは、汎用性が非常に高く、今後の医学生物学に大変有用であると考えられる。

図1.A

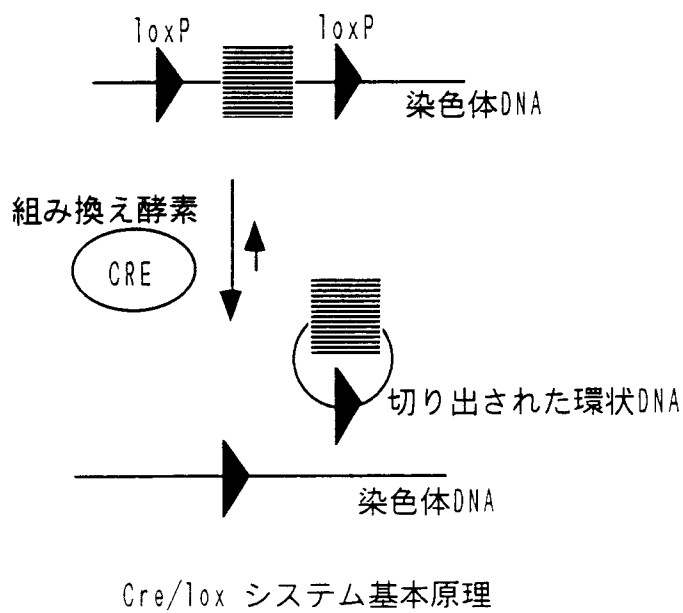
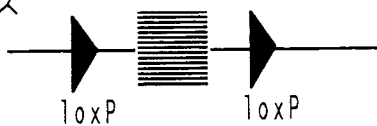


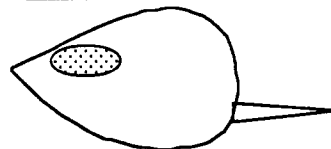
図1.B

対象遺伝子をloxPではさみこんだ  
floxedマウス



Creたんぱくを特定の領域に  
発現したcreマウス

Creたんぱく発現領域

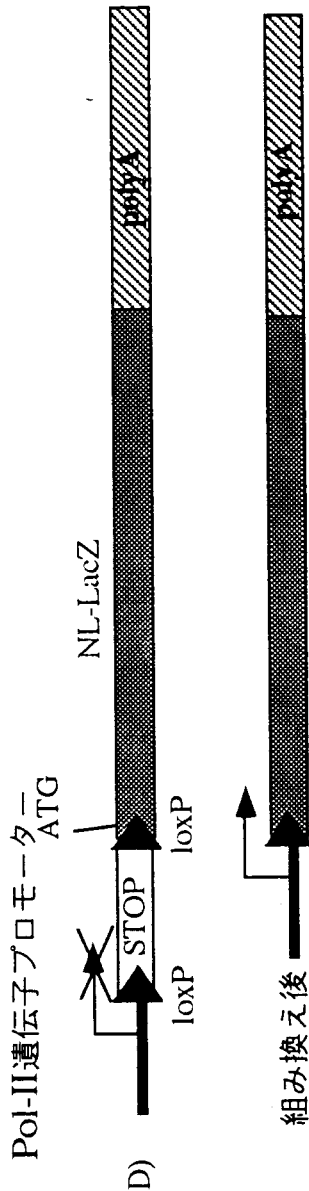
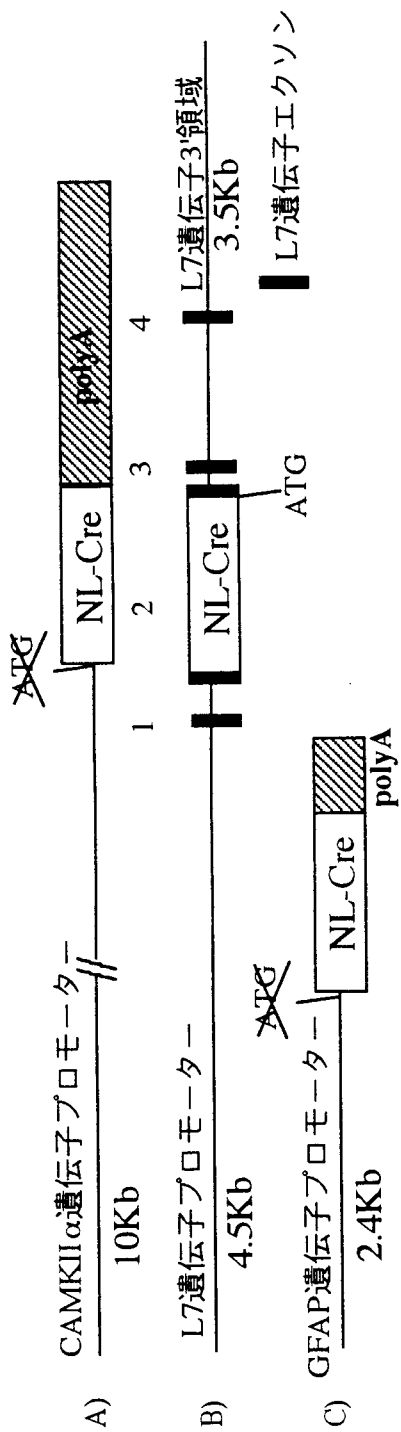


Creたんぱく発現領域でのみ  
対象遺伝子の欠損が生じた子孫



コンディショナル遺伝子ノックアウト動物の作製略図

図2



## トランスジェン構造模式図

- A)-C)はcreマウス用、D)はテスターマウス用のトランスジェン。  
 A)CAMIIKa-NLCreトランスジェン B)L7-NLCreトランスジェン C)GFAP-NLCreトランスジェン  
 D)PolIII/stop/nLacZトランスジェン。stopには転写終結シグナル遺伝子が含まれる。下段は、組み換え後の構造図。

図3



(A)



(B)

中枢神経系特異的コンディショナル遺伝子ノックアウトの例

(A) flox-tester mouse (control)

(B) flox-tester mouse X CAMKII  $\alpha$ Cre22 mouse

脳、脊髄領域のみ LacZ 染色が認められる。