

脳由来神経栄養因子コンディショナル トランスジェニックマウスの作成

鄭 小 芳

新潟大学脳研究所分子神経生物学分野

(主任：那波宏之教授)

Generation of BDNF Conditional Transgenic Mice

Xiaofang ZHENG

Department of Molecular Neurobiology

Brain Research Institute, Niigata University

(Director: Prof. Hiroyuki NAWA)

要 旨

中枢神経系における最も主要な神経栄養因子である脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) を、部位、細胞種、時期特異的に過剰発現させる目的で lox P-BDNF トランスジェニックマウスを作成した。BDNF が前脳特異的に生後より発現するように、 α カルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II プロモーター制御下で Cre-recombinase を発現するマウスと交配したところ、大脳皮質などで強い BDNF の発現が観察された。ここで樹立した lox P-BDNF トランスジェニックマウスは神経細胞死やシナプス可塑性などを個体レベルで研究する優れたツールとなりうる。

キーワード：BDNF, Cre-lox P システム, CaMK II, EGFP, 脳

はじめに

脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) は中枢神経系でもっとも主要な神経栄養因子である。その生理作用は多岐にわたり、種々の神経細胞の分化、成熟、生存維持に働いている¹⁾。さらに近年、BDNF は成体の脳でも働き、神経伝達を調節し、シナプスの可塑性に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた²⁾⁻⁴⁾。これらの作用は主に神経細胞

の初代培養系を用いて詳細に検討されてきたが、発生工学的手法の進歩に伴い、遺伝子改変マウスを用いた研究がなされるようになってきた。BDNF 及びその受容体である Trk の通常のノックアウトマウスは生後すぐに死んでしまう⁵⁾⁶⁾。これは末梢神経細胞の生存に BDNF/Trk シグナルが必須な為である。BDNF はシナプス可塑性を調節しているため、成体での学習記憶といった脳高次機能への関わりに関心が集まってきた。そこで Trk のコンディショナルマウスが作成され、前

Reprint requests to: Xiaofang ZHENG
Department of Molecular Neurobiology
Brain Research Institute
Niigata University
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学脳研究所分子神経生物学 鄭 小 芳
050000 中国河北省石家庄市市庄路 66 号省委党史
書工作部 421 室
鄭華山 (方)

脳特異的なプロモーターである α カルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII (α CaMK II - Cre) マウスとの交配し、成体脳の前脳でBDNFが欠損しているモデルが作成されている。このマウスは学習障害があることが報告されている⁷⁾。

一方、BDNFの過剰発現マウスはアクチンプロモーターを用いた通常のトランスジェニック法により作成されている⁸⁾。しかしながらこの過剰発現のレベルは非常に低く(1.2-1.3倍ほど)また、全身性にBDNFが発現しているため、脳機能の解析には不向きであった。そこで本研究ではCre-loxシステム⁹⁾を利用したBDNFのコンディショナルトランスジェニックマウスを作成することを目的とした。lox-BDNFマウスの系統が確立されれば、様々な部位特異的、あるいは発達段階特異的な遺伝子プロモーターとCreを持つマウスとの交配により脳の特定部位でのBDNFの誘導発現が可能になりBDNFの生理作用の解明の強力なツールとなることが期待される。

方 法

全ての組換え実験、動物実験に関しては新潟大学のガイドラインに従い、承認を受けている。

1. lox-BDNF コンストラクトとマウスの作成

図1に示すコンストラクトを構築し、培養系で発現、組換えの確認後、トランスジェニックマウス作成を日本SLCに委託した。 α CaMK IIプロモーターを持つCreマウスはUCLAのProf. Alcino J Silvaより供与を受けた。

2. サザンブロット

マウス尾部から抽出したゲノムDNAを制限酵素Hind IIIあるいはPst Iで消化し、ゲノムDNAを調整した。これをアガロースゲル電気泳動で分離し、Hybondメンブレンに移し、ラットBDNF(52-901)およびEGFP(全長)をプローブとして常法によりサザンブロットを行った。

3. PCR

導入したlox-BDNFがゲノムに組み込まれていることと、Cre-recombinaseによる組換えが起こっているかを調べる為に、PCR解析を行った。ゲノムDNAは組換えの期待される脳領域、大脳皮質、海馬、線条体から抽出し、図4に示したlox上流(5'-CCGCACGTCTAAGAAACCAT TA-3')とBDNFコーディング領域(5'-AAG GATGGTCATCACTCTTCTC-3')に設定したプライマーを用いて行った(25サイクル、94°C 1min, 60°C 1min, 72°C 2min)。組換えの起こっていないゲノムDNAでは1.6kbpの、組換えの起こっているゲノムDNAでは277bpのPCR産物が期待される(図4)。

4. 培養細胞へのトランスフェクション

HEK293細胞にlox-BDNFとpGK-Creを同時にFuGene(Roche)試薬を用いてトランスフェクションし、48時間後に蛍光顕微鏡でEGFPの蛍光を観察した。またこのときELISA法によりBDNFの定量を行った。BDNFのELISAは既報に従って行った¹⁰⁾。

5. 免疫組織化学

マウスを深麻酔下に灌流固定し、脳を取り出し後固定し、凍結包埋した。クリオスタットにて10 μ mの凍結切片を作成し、抗BDNF抗体(Chemicon)を用いて免疫組織化学染色を行った。2次抗体はビオチン化抗ラビットIgG抗体を用い、Vectastain(Vector)を用いABC法-DABで発色した。EGFPの蛍光は蛍光顕微鏡で切片を観察した。

結 果

1. lox-BDNF コンストラクト

図1にコンストラクトの概要を示す。CAG(サイトメガロウイルスエンハンサー、 β アクチンプロモーター)の下流にストップコドンを含むストップカセットをloxで挟み、その下流にラットBDNFcDNAをつないだ。さらに発現が可視化で

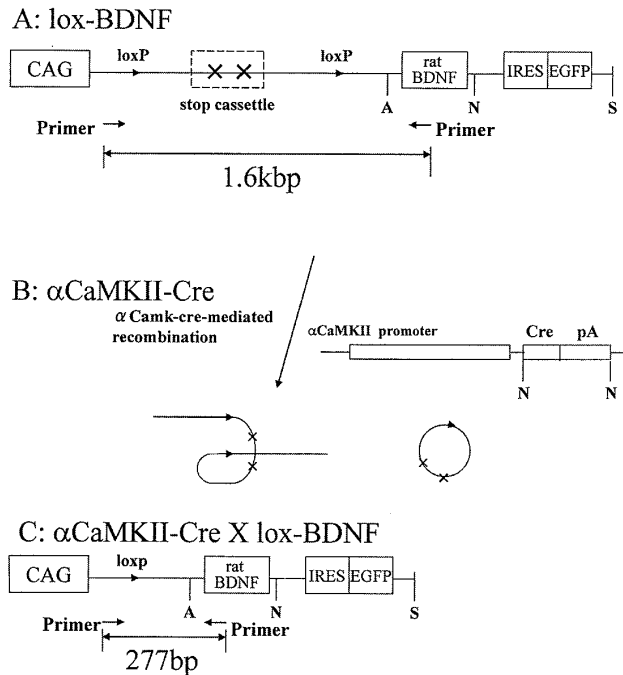


図1 遺伝子ベクターのコンストラクト
本実験で用いたコンストラクトを示す。説明は本文参照。略号 A: Asu II, N: Nsi I, S: Sal I

きるように IRES (internal ribosome entry site) の下流に EGFP をつないだ。このままゲノムに組み込まれても CAG プロモーター下流のストップコドンによって、BDNF や EGFP は発現しない。Cre と共発現することによって組換えが起こって lox ではさまれた領域が欠失し、ストップコドンが消失することによって BDNF および EGFP が発現する。

2. 培養系での組換えの確認

培養細胞系を用いて、上記のコンストラクトが Cre によって組換えられ、BDNF と EGFP が発現することを確認した。HEK293 細胞に lox-BDNF ベクター単独及び Cre 発現ベクターとの共発現を行った。図1に示すプライマーにて PCR を行くと、共発現した細胞にのみ 277bp の組換え DNA が確認された (図2A)。蛍光顕微鏡観察により EGFP のシグナルも検出された (図2C)。さらに実際の BDNF を ELISA 法にて定量したとこ

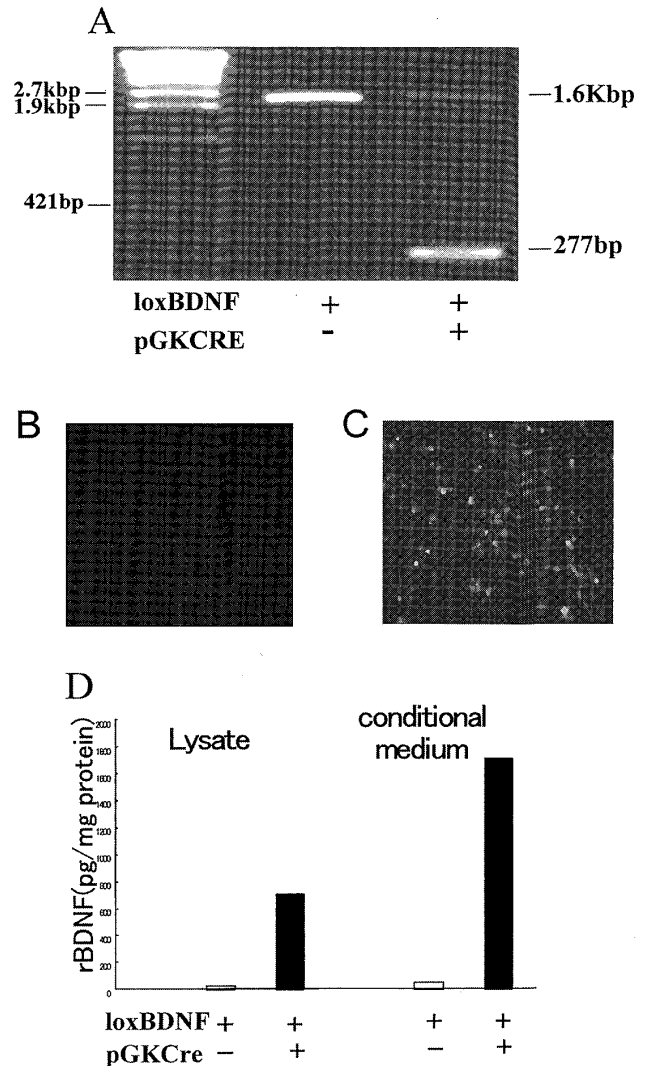


図2 培養系における組換えの確認

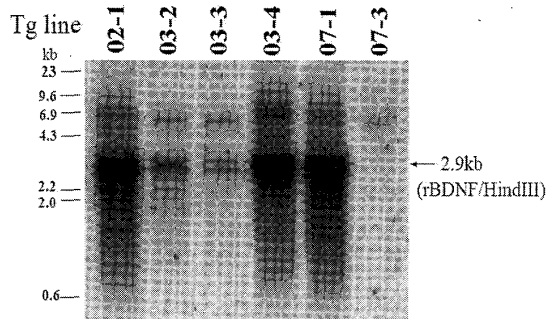
A, 培養細胞 (HEK293) に lox-BDNF 単独、及び pGK-Cre との共発現させた細胞ゲノム DNA の PCR. EGFP の発現を loxBDNF 単独 (B), 及び共発現 (C) の細胞で観察したもの。D, BDNF 蛋白の定量結果。

ろ、共発現した細胞では大量の BDNF が細胞内に含有されさらに放出されていることがわかった (図2D)。

3. マウスの系統チェック

PCR にてマウスゲノム DNA をチェックしたのち、ゲノムへ導入されたコピー数を調べるためにサザンブロットをおこなった。図3に示すように、

A



B

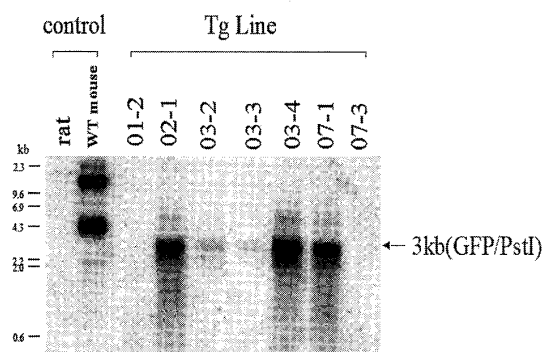


図3 lox-BDNF ベクターを導入したマウス系統の確認

サザンブロット法によりゲノムでの BDNF (A), EGFP (B) のレベルを調べたもの。

EGFP, BDNF のプローブでハイブリダイズしたところ系統により様々なコピー数の差異がみられた。Cre による組換え効率を考え、最もコピー数の少ない 03-3 系統を実験に用いた。

4. マウス脳での組換えの確認

α CaMK II - Cre マウスと上記 03-3 系マウスの交配により得たマウス (α CaMK II - Cre X lox-BDNF) 脳での組換えの確認を行った。 α CaMK II は前脳部の興奮性神経細胞で生後に発現するため、生後 1-2 ヶ月のマウス脳の大脳皮質、海馬、線条体からゲノム DNA を抽出して PCR を行った。図 1 に示すプライマーを設定すると、図 4 に示すようにいずれの脳部位においても、ホストの lox-BDNF マウスでは 1.6kbp のバンドが、 α CaMK II - Cre マウスと交配したマウスで

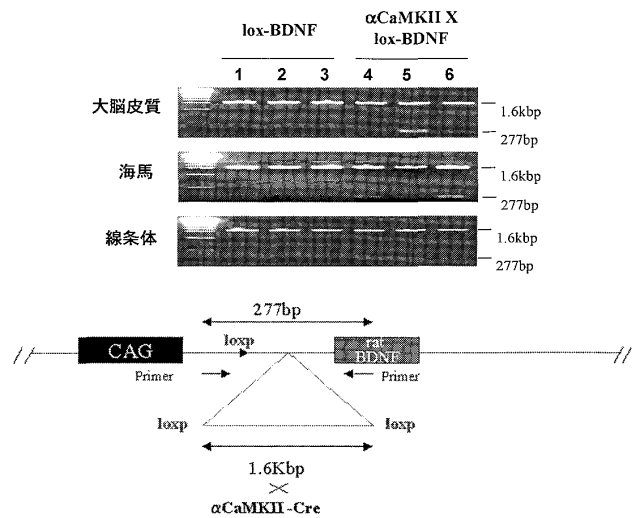


図4 マウス脳での組換えの確認

α CaMKII の発現する脳の 3 部位で Cre による組換えを脳組織の DNA を用いた PCR 法で確認した (n=3 mice in each group)。

は 1.6kbp のバンドに加えて 277bp のバンドが確認された。このことはこれらの脳部位において確かに lox 領域の組換え欠失が起こっていることを示している。

5. マウス脳での EGFP と BDNF の発現

α CaMK II - Cre マウスと上記 03-3 系マウスの交配により得たマウス (α CaMK II - Cre X lox-BDNF) 脳で実際に EGFP, BDNF が発現していることを組織学および免疫組織化学的に検討した。凍結切片の蛍光顕微鏡観察の結果、大脳皮質の神経細胞で EGFP の蛍光が観察された (図 5I)。この蛍光は野生型及び lox-BDNF マウスの脳では観察されなかった。次に BDNF の過剰発現を調べるため抗 BDNF 抗体を用いた免疫染色を行った。 α CaMK II - Cre X lox-BDNF マウス脳では BDNF 免疫強陽性の神経細胞が多数観察された (図 5G, H)。野生型マウス脳での BDNF の免疫組織化学はもともとシグナルが弱い。本実験で用いた抗 BDNF 抗体 (Chemicon) はラット、ヒトの BDNF にアフィニティが高いため、野生型および lox-BDNF 脳では BDNF 陽

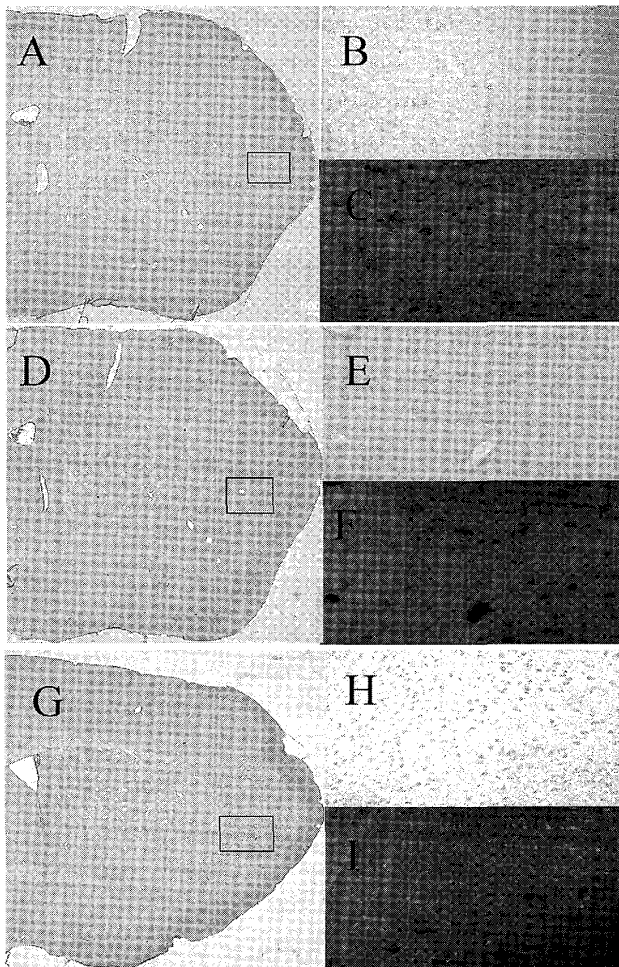


図5 マウス脳におけるBDNFとEGFPの発現
野生型 (A-C), lox-BDNF (D-F), α CaMK II-Cre X lox-BDNF (G-I), 各マウス大脳皮質におけるBDNF (AB, DE, GF) とEGFP (C, F, I) の発現. BC, EF, HIはA, D, Gの四角で囲った部分の拡大図 (scal bar = 500 μ m).

性細胞はほとんど観察されなかった。

以上の結果は、脳の特定の神経細胞でBDNFを過剰発現し、さらにEGFPの蛍光によってBDNFを発現誘導された細胞を可視化されるマウスを作成することができたことを示している。

考 察

BDNFの成体脳での詳細な生理機能を調べる

目的で、部位、細胞および発達段階特異的なBDNFの過剰発現を可能とするマウスの作成を行った。従来アクチンプロモーターを用いBDNFを発現するトランスジェニックマウスは報告されていたが、発現レベルが低く、また全身性に発現することなどから、脳機能の解析には必ずしも有用ではなかった。本研究では α CaMK II-Creマウスと交配することによって、前脳興奮性神経細胞に特異的にBDNFを過剰発現させることに成功したが、他のプロモーターをもつCreマウスと交配することによって、違った領域、細胞でBDNFを発現させることも可能である。実際、予備的な実験として抑制性神経伝達物質のGABA合成酵素GAD (glutamic acid decarboxylase)のプロモーターを持つCreマウス (GAD-Cre)との交配により、小脳などでBDNFを過剰発現するマウスも得ている。このように異なったプロモーターを持つマウスと交配することによって、例えばグリア細胞でのみBDNFを過剰発現するマウスの作成も可能である。また異なったアプローチとして、Creを発現するウイルスベクターなどを脳内 (あるいは他の臓器) の局所的に導入し、特定領域、特定時期にBDNFを過剰発現することが可能となる。

BDNFはその神経細胞生存維持作用から神経変性疾患への関与が指摘され注目されていた¹⁾。加えて最近の研究から神経細胞の生死だけではなく、シナプス伝達などの機能的な調節をしていることが明らかとなるに伴い、精神疾患などの機能的脳障害への関与も指摘されるようになっていく⁴⁾。本研究で作成されたlox-BDNFマウスはこのようなモデルマウスとの併用も可能で、BDNFの生理的、病理的役割の解明に有用であると考えられる。

謝 辞

本研究を行うに当たり一貫した御指導を頂いた、脳研究所分子神経生物学分野、那波宏之教授に深謝いたします。また御助言を頂いた武井延之助教授をはじめとした分子神経生物学分野のメンバーの皆様に感謝します。本研究は学術創成研究費によって実施された。

参考文献

- 1) Lewin GR and Barde YA: Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 19: 289 - 317, 1996.
- 2) Thoenen H: Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270: 593 - 598, 1995.
- 3) Nawa H and Takei N: (2001) BDNF as an anterograde; A novel neurotrophic relationship between brain neurons. *Trends Neurosci* 24: 683 - 684, 2001.
- 4) 武井延之, 那波宏之: ニューロトロフィンによる脳機能の調節—細胞応答から行動変容まで—. *生化学* 76: 111 - 123, 2004.
- 5) Ernfors P, Lee KF and Jaenisch R: Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368: 147 - 150, 1994.
- 6) Klein R, Smeyne RJ, Wurst W, Long LK, Auerbach BA, Joyner AL and Barbacid M: Targeted disruption of the Trkp neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* 75: 113 - 122, 1993.
- 7) Minichiello L, Korte M, Wolfner D, Kuhn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T and Klein R: Essential role for Trkp receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24: 401 - 414, 1999.
- 8) Croll SD, Suri C, Compton DL, Simmons MV, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Wiegand SJ, Rudge JS and Scharfman HE: Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience* 93: 1491 - 1506, 1999.
- 9) Yu Y and Bradley A: Engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nat Rev Genet* 2: 780 - 790, 2001.
- 10) Nawa H, Carnahan J and Gall C: BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci* 7: 1527 - 1535, 1995.
- 11) Thoenen H and Sendtner M: Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci* 5: 1046 - 1050, 2002.

(平成18年1月18日受付)