

原

著

# アクアポリン 4 遺伝子欠損誘導型マウスの作成

菅 井 智 明

新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野

(主任：崎村建司教授)

## Generation of Aquaporin 4 Conditional Knockout Mice

Chiaki SUGAI

*Department of Cellular Neurobiology,**Brain Reserch Institute, Niigata University**(Director: Prof. Kenji SAKIMURA)*

### 要 旨

脳における水の代謝と移動は、その機能の恒常性を維持するために必須な事項であると考えられている。アクアポリン (AQP) は、哺乳動物において様々な部位で発現しているが、神経系の主要な分子は AQP4 である。本研究ではアストロサイトの AQP4 に着目し、この細胞で特異的に AQP4 を欠失させ、脳機能と水チャネルとの関連を解析することを計画した。そのために Cre/loxP システムにより、部位・時期特異的に AQP4 を欠失できるマウス AQP4-flox 系統を樹立した。そしてこのマウスと全身で Cre リコンビネースを発現するマウスとを交配することにより AQP4 が Cre 活性依存的に欠失することを確認した。本研究で樹立した AQP4-flox マウスは、C57BL/6 系統の遺伝子背景をもつため、脳高次機能における AQP4 の役割を解析する上で有用なツールとなると考えられる。

キーワード：アクアポリン 4, コンディショナルターゲティング法, Cre/loxP システム, AQP4-flox マウス系統, アストロサイト

### はじめに

脳における水の代謝と移動は、その機能の恒常性を維持するために必須な事項であると考えられている。しかし、脳浮腫に関連する研究以外に脳

機能における水の役割についての研究はほとんど無いのが現状である。細胞膜は脂質二重層なのでほとんど水は透過しないが、実際には赤血球膜のように水の透過性の大きい膜もあれば、透過性の低い膜もある。この差違が水のみを選択的に通過

Reprint requests to: Chiaki SUGAI  
Department of Cellular Neurobiology  
Brain Reserch 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  
新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野

菅井智明

させるチャネルタンパク、つまりアクアポリン(AQP)の存在の有無によることが近年明らかになり、神経系を含む多くの組織における水輸送の分子的基盤が与えられた<sup>1)2)</sup>。哺乳動物においてAQPは11のサブタイプが報告されている。AQPは膜を6回貫通する比較的簡単な構造をした膜タンパクであり、おおよそ30 kDaの単量体で、ホモ4量体を形成する。このファミリーでよく保存されているアスパラギン-プロリン-アラニン(NPA box)は膜の両サイドからからみ合っただ時計のような構造物を作り、その中心に水の通り穴(ポア)を形成する。ポアは水分子を1つしか通さないsingle fileの構造であるために、大量の水分子を選択的に通すことができる<sup>3)</sup>。

脳と脊髄では少なくとも、AQP1, 4, 9の3種類の発現が報告されているが、主要な分子はAQP4であり、脳と脊髄のアストロサイト、脳室や蝸牛の上皮細胞、網膜のミュラー細胞で発現している<sup>4)~6)</sup>。一方、AQP4は腎臓の集合管側膜にも多く発現しており、腎機能への関与も考えられている<sup>7)8)</sup>。

本研究では脳、アストロサイトのAQP4に着目し、この細胞で特異的にAQP4を欠失させ、脳機能と水チャネルとの関連を解析することを計画した。そのため、遺伝子ノックアウトが誘導可能なCre/loxPシステム<sup>9)</sup>によるコンディショナルターゲティング法を用いて、マウスを作成することにした。

## 材料と方法

### アクアポリン4遺伝子のクローニング

C57BL/6マウスcDNAライブラリーをテンプレートとしてPCRを行い、プライマーAQ2(5'-CCAGCTGTGATTCCAAACGA-3')、AQ4(5'-GGAAAGCCAATACACTAGTT-3')を用いて710 bp、AQ1-1(5'-AAGGCATGAGTGACGGAGCT-3')、AQ3(5'-AGCGCCCATGATTGGTCCAA-3')を用いて730 bpのDNA断片を増幅した。

これらのPCR産物をpBluescript II KS(-)

のEcoR Vサイトにサブクローニングし、それぞれpAQP4#3、pAQP4#2を得た。pAQP#3より710 bpのEcoR I-Hind IIIフラグメントを作成し、プローブAとした。pAQP#2より730 bpのEcoR I-Spe Iフラグメントを作成し、プローブBとした。C57BL/6マウスゲノムライブラリーをプローブA、Bを用いたプライクハイブリダイゼーション解析によりスクリーニングし、得られたクローン( $\lambda$  14-1,  $\lambda$  411-1)をpBluescript II KS(-)のSal Iサイトにサブクローニングし、クローン(p14-1, p411-1)を得た。

### ターゲティングベクターの作成

p14-1より1 kbp、Pst I(平滑化)-Xho Iフラグメントを作成した。このフラグメントを、FRT配列で挟んだpgk-neo-pAカセットの両端にloxP配列を挿入した配列を持つpBluescriptをベースにしたベクターpNeo-MC/lox#5のSma I-Xho Iフラグメント5 kbpとライゲーションし、pA4Neo-loxとした。次にp14-1をテンプレートとしてKpn IリンカーをつけたプライマーNhe I primer(5'-CGGGGTACCTTGGGGGATCCACAGCTAGC-3')とPst I primer(5'-CGGGGTACCC TGCAGAAAAAGCCATGGTTAAC-3')を用いたPCR(pfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase, Stratagene)を行い、PCR産物をKpn Iで消化して、4.5 kbpのフラグメントを作成した。このフラグメントとpA4Neo-loxのKpn Iフラグメントの6 kbpをライゲーションして、pA45'-Neo-loxとした。

また、p411-1をテンプレートとしてHind IIIリンカーをつけたプライマーDT1 primer(5'-CCCAAGCTTGCAGAGGCCTGATGCAAAAG-3')とDT2 primer(5'-CCCAAGCTTACAGCGCC-CATGATTGGTCC-3')を用いたPCRを行い、PCR産物をHind IIIで消化して、3.8 kbpのフラグメントを作成した。このフラグメントとpMC1DTApA<sup>10)</sup>のNot I-Hind III(平滑化)にマルチクローニングサイトを挿入したベクターpDT-MC#3のHind IIIフラグメント4.5 kbpをライゲーションして、pA4-3' DTとした。pA45'-

Neo-loxのSal I-Asc Iフラグメント7.3 kbpとpA43'-DTのSal I-Asc Iフラグメント8.3 kbpをライゲーションして、tvAQP4-flox1を作成した。

#### ターゲティングベクターの改変

tvAQP4-flox1の3'相同組換え領域を延長するために以下の構築を行った。p411-1をEcoR V-Xba I (平滑化)し、セルフライゲーションしてp411-VXとした。p411-VXのBam H I-Not Iフラグメント5 kbpとpA43'-DTのHind III-BamH Iフラグメント1 kbp、pDT-MC#3のHind III-Not Iフラグメント4.5 kbpをライゲーションして、pA43'-DT2とした。pA45'-Neo-loxのSal I-Asc Iフラグメント7.3 kbpとpA43'-DT2のSal I-Asc Iフラグメント10.5 kbpをライゲーションして、tvAQP4-flox2を作成した。

#### C57BL/6 ES 細胞の培養

遺伝子組換えマウスはC57BL/6マウス由来細胞株RENKA細胞(崎村らが樹立)を用いて作出した。なお、ES細胞培養の詳細については、北山らの報告に従った<sup>11)</sup>。

Sal Iによって直線化した2.5 pmolのtvAQP4-floxあるいはtvAQP4-flox2を、250V、960  $\mu$ F、R=∞の条件で電圧ポレーションにより $1 \times 10^7$ 個のES細胞に導入した。トランスフェクション後38から48時間後にG418(175 mg/ml)選別を開始し、7日後に耐性コロニーをピックアップした。これらコロニーからDNAを抽出し、サザンブロット解析により標的遺伝子組換えを起こしたES細胞クローンを同定した。これらのES細胞クローンを8細胞期のICRマウス胚にマイクロインジェクションし、胞胚期まで培養した後、偽妊娠したICRマウスの子宮に移植した。得られたキメラマウスをC57BL/6マウスと交配して遺伝子組換えマウス系統を樹立した。

#### サザンブロット解析

ネオマイシン耐性を持つES細胞クローンのゲノムDNA、もしくはマウス尾より抽出したゲノ

ムDNAをSac IあるいはEcoR Iで消化し、0.6%アガロースゲルで電気泳動を行った。これをナイロンメンブレンに転写し、5', 3', Neoを用いてハイブリダイズした<sup>12)</sup>。

クローンp14-1をテンプレートとして、プライマーAQ1-1(5'-AAGGCATGAGTGACTGAGCT-3')とprobe5'-2(5'-GGTGAGAAA GGGTGCTGGAG-3')を用いたPCRを行い、得られたPCR産物をNhe Iで消化し、580 bpのフラグメントを精製して5'プローブとした。C57BL/6のゲノムDNAをテンプレートとして、プライマーprobe3'-1-1(5'-CCAGTGACAGCATTCAGTAT-3')とprobe3'-2-1(5'-TGAAGTGCATAGTGCCGTTTC-3')を用いたPCRを行い、550 bpのフラグメントを精製して3'プローブとした。pKJ2(X+)よりPst Iフラグメント580bpフラグメントを精製し、Neoプローブとした。それぞれのプローブの位置を図2Aに示した。

Sac Iで消化したゲノムでは5'プローブにより、野生型13.2 kbp、Neo型15 kbp、KO型12.7 kbpを検出した(図2B, 3A, 4A)。Sac Iで消化したNeo型のゲノムにおいてはNeoプローブにより5'プローブと同様の15 kbpを検出した(図2B)。EcoR Iで消化したゲノムでは3'プローブにより、野生型12.8 kbp、Neo型10.8 kbpを検出した。

#### PCR 解析

ネオマイシン耐性を持つES細胞クローンのゲノムDNA、もしくはマウス尾より抽出したゲノムDNAをテンプレートとして、プライマーlox-5'(5'-TATACCCTGCCTTTCGGAGG-3')とlox-3'(5'-ACCCATGAGAAGTCTGCTGTA-3')を用いてKOD Dash (TOYOBO)によるPCRを行った。2%アガロースゲルを用いた電気泳動により、野生型260 bp、Neo型320bpを検出した(図2C, 3B)。また、プライマーA4loxF(5'-AGGTTGG TAGAAGACTCAAG-3')とlox-3'(5'-ACCCATGAGAAGTCTGCTGTA-3')を用いてPCRを行い、野生型1000 bp、KO型260 bpを検出した(図4B)。

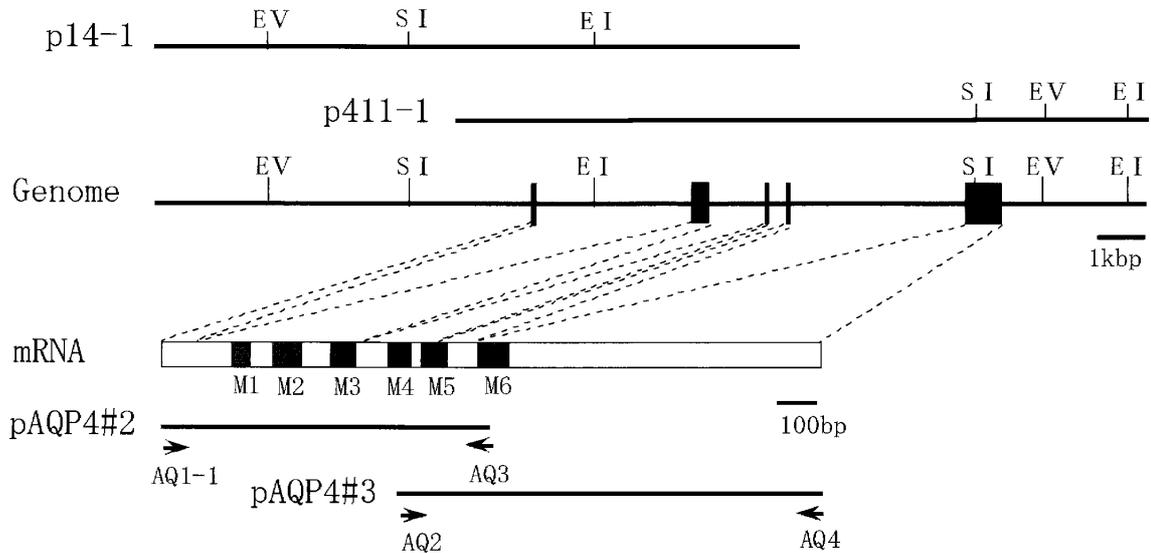


図1 アクアポリン4遺伝子のクローニング

上より、ゲノムクローン、アクアポリン4遺伝子の構造、mRNAの構造、cDNAクローン、cDNAクローニングに用いたプライマー（矢印）を示している。エクソンは黒い長方形で表示した。EI, EcoR I; EV, EcoR V; SI, Sac I; M1-M6, 推定膜貫通領域。

## 結 果

### アクアポリン4遺伝子のクローニングとターゲティングベクターの構築

本研究では、アストロサイト特異的なアクアポリン (AQP) 4 遺伝子のノックアウトマウス作成を目的として、Cre/loxP システムを用いた AQP4 遺伝子 flox マウスを作成した。まず、C57BL/6 マウス cDNA ライブラリーより、RT-PCR を用いてエクソン 0 から 3 を含む 710 bp (pAQP#2) と、エクソン 2 から 4 の一部を含む 730 bp (pAQP#3) をクローニングした。pAQP#2 の EcoR I - Hind III フラグメントをプローブとして C57BL/6 マウスゲノムライブラリーをスクリーニングし、18.1 kbp のインサートを持つ 2 個の陽性クローン (p14-1, p12-1) を得た (図 1)。これらは、エクソン 3 から 5'-非転写領域を含んでいたが、エクソン 3 の下流を持っていなかった。そこで、pAQP#3 の EcoR I - Spe I フラグメントをプローブとしてスクリーニングを行い、15.6 kbp のインサートを持つ陽性クローン (p411-1) を得た

(図 1)。このクローンはエクソン 2 から 3'-非転写領域までを含んでいた。

取得したクローンを用いて、ターゲティングベクターを作製した。膜貫通領域とポア構成領域をコードしたエクソン 2, 3 を含む 1 kbp Pst I - Xho I フラグメントをクローン p14-1 より作成、2 つの loxP 配列の間に挿入し、欠失させる標的領域とした。また、PCR を用いて p14-1 からエクソン 1 を含む 4 kbp の 5' 相同組み換え領域を取得し、5' 側の loxP 配列の上流に挿入した。3.8 kbp の 3' 相同組み換え領域はクローン p411-1 から PCR を用いて取得し、3' 側 loxP 配列の下流へ挿入してターゲティングベクター tvAQP4-flox1 とした (図 2A)。

直線化したターゲティングベクターを C57BL/6 ES 細胞へエレクトロポレーションした。ネオマイシン耐性を持つ 820 クローンを Sac I で消化し、5' プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行ったが、陽性クローンは得られなかった。そこで、p411-1 クローンをを用いて 3' 相同組み換え領域を 2.2 kbp 下流へ延長したベクター



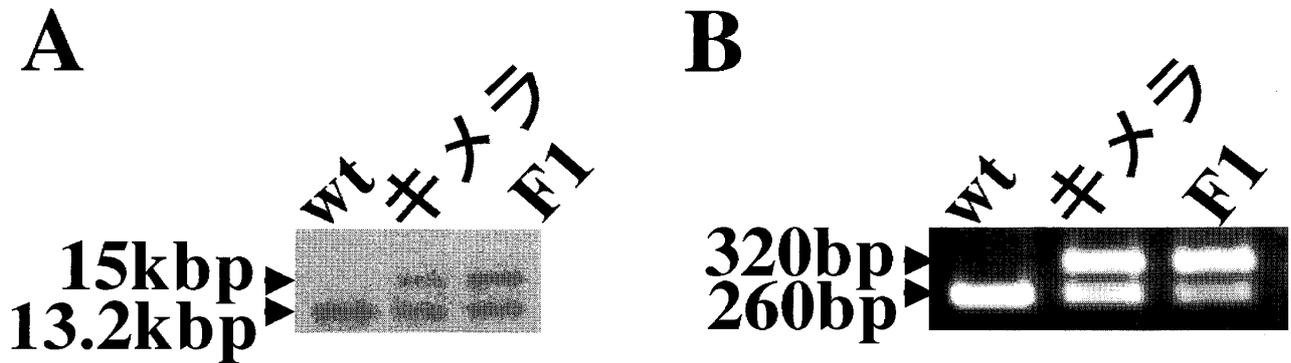


図3 AQP4-flox マウス系統の樹立

- A. AQP4-flox マウスのサザンプロットによる遺伝子型解析. キメラ, キメラと C57BL/6 の仔 (F1) および野生型 (Wt) マウスの尾より抽出したゲノム DNA を Sac I で消化し, 5' プローブでハイブリダイゼーションを行った結果を示した.
- B. AQP4-flox マウスの PCR による遺伝子型解析. キメラ, F1 および野生型 (Wt) マウスのより抽出したゲノム DNA を用い, lox5', lox3' プライマーで PCR を行った結果を示した.

tvAQP4-flox2 (図 2A) を作製し, ES 細胞へのエレクトロポレーションを行った. ネオマイシン耐性を持つ 651 クローンをサザンプロット解析によりスクリーニングした結果, 5 個のクローン (No 122-104, 125-2, 128-71, 129-13, 129-136) で野生型の 13.2 kbp と変異型の 15 kbp の 2 本のバンドを検出した. これらのクローンに対して 3' 側の loxP 配列を検出する PCR を行ったところ, No 125-2, 128-71 のクローンでは野生型の 260 bp のみが検出され, 変異型の 320 bp が検出されなかった. PCR 解析で陽性であった 3 クローン No 122-104, 129-13, 129-136 はさらに 3' プローブと Neo プローブを用いてサザン解析を行い, 相同組換えが正しく起こっていることを確認した. これらのクローンのサザン解析, PCR 解析の結果を図 2B, C にそれぞれ示した.

#### AQP4-flox マウス系統の樹立

相同組換えを確認した ES 細胞クローンをマウス初期胚にマイクロインジェクションすることにより, キメラマウスを作製した. ES の寄与が大きいキメラマウスを選択し, C57BL/6 と交配することにより F1 個体を得た. これら F1 マウスの尾の

ゲノムを抽出し, Sac I で消化後, 5' プローブでハイブリダイゼーションを行ったところ, 約半数の個体で野生型 13.2 kbp と AQP4<sup>lox</sup>; neo 型 15 kbp が検出された (図 3A). この結果から, キメラマウスよりターゲットングした変異アレルが, 生殖系列伝達することを確認できた. 得られた F1 マウスを C57BL/6 と交配させ, AQP4-flox マウス系統を樹立した. 系統維持における遺伝子型判定には PCR 解析を用いた. プライマー lox5'-lox3' 間を増幅する PCR を行うと野生型で 260 bp, AQP4<sup>lox</sup>; neo 型あるいは AQP4<sup>lox</sup>; -型で 320 bp が検出される (図 3B).

#### AQP4 null knockout マウス系統の樹立

AQP4 null knockout (KO) マウスを作成するために, 全身で Cre リコンビネースを発現する TLCN-Cre マウス<sup>13)</sup> と樹立した AQP4-flox マウスを交配した. 得られた仔の尾のゲノムを用いてサザンプロット, PCR を行い, 遺伝子型を解析した. DNA を Sac I で消化し, 5' プローブでハイブリダイゼーションを行ったところ, F1 のマウスにおいて野生型 13.2 kbp と AQP4<sup>-</sup>型 12.7 kbp が検出された (図 4A). PCR 解析においてもプラ

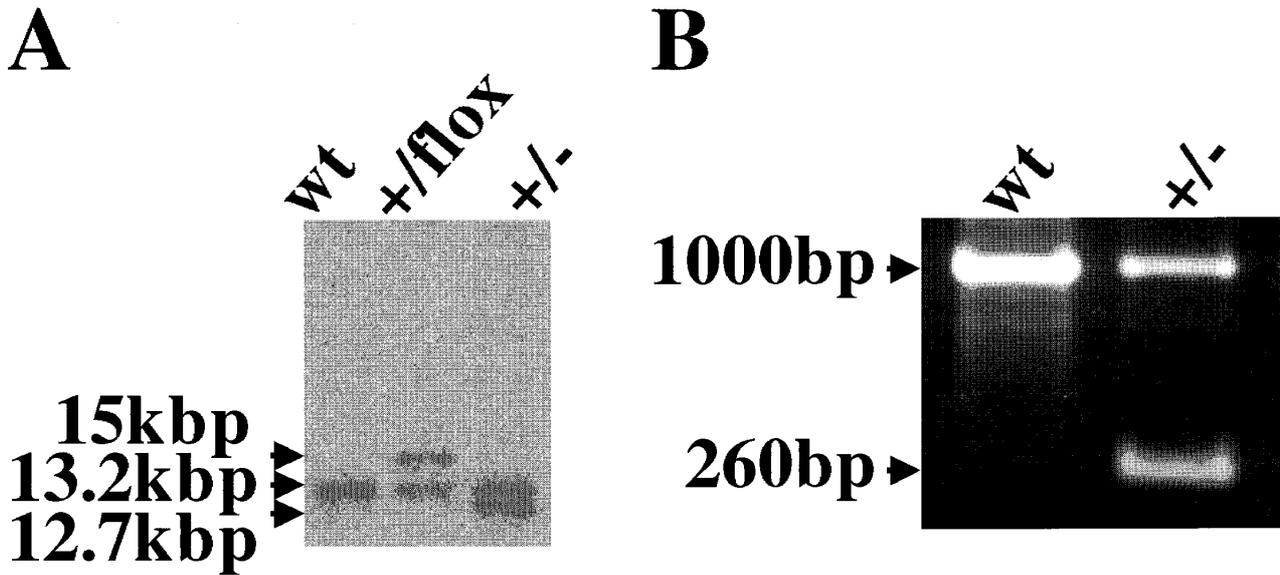


図4 AQP4-null KO マウス系統の樹立

- A. AQP4-KO マウスのサザンプロットによる遺伝子型解析.ヘテロ KO (+/-), 野生型 (Wt) マウスの尾より抽出したゲノム DNA を Sac I で消化し, 5' プローブでハイブリダイゼーションを行った結果を示した.
- B. AQP4-KO マウスの PCR による遺伝子型解析.ヘテロ KO (+/-), 野生型 (Wt) マウスの尾より抽出したゲノム DNA を用い, A4loxF, lox3' プライマー で PCR を行った結果を示した.

イマー A4loxF-lox3' 間を増幅する PCR を行い, 野生型 1000bp と AQP4<sup>-</sup>型 260bp が検出された (図 4B). 以上の結果から, 標的遺伝子配列をヘテロ欠損したマウスが同定され, これらのマウスを用いて AQP4 KO マウス系統を樹立した. また, この結果から AQP4-flox マウスにおいて Cre リコンビネース依存的に標的遺伝子配列を欠損できることが明らかとなった.

### 考 察

本研究では, Cre/loxP システムを用いて, 部位・時期特異的に AQP4 遺伝子を欠損するマウスを作成するために Cre の標的配列である loxP 配列でエクソン 2, 3 を挟んだ AQP4-flox マウス系統を樹立した. AQP4 は膜貫通領域 (M) 2-3 間のループ C と M5-6 間のループ E にあるアスパラギン-プロリン-アラニン (NPA box) を膜の

両サイドからからみ合わせ, その中心に水の通り穴 (ポア) を形成すると考えられている. AQP4-flox マウスでは Cre 活性依存的にエクソン 2, 3 を欠失させるが, この部分には膜貫通領域 (M) 4-5 及び NPA box を含むループ E を含むために AQP4 の機能をノックアウトできると考えられる. 本研究で作成した AQP-flox マウスは Cre 発現マウスを交配することにより, flox 領域が組換わり遺伝子欠損が起こることが確認された. このことは, アストロサイト特異的に Cre を発現するマウスとの交配により, 部位特異的に AQP4 をノックアウトできることを意味する.

本研究では, 最初に作成したターゲティングベクター tvAQP4-flox1 において 820 クローンのネオマイシン耐性クローンを解析したが, 相同組換え体を得ることができなかった. 一方, 3' 側相同組み換え領域を 3.8 kbp から 6 kbp に 2.2 kbp 延長したベクター tvAQP4-flox2 では 651 クローン

より5個の相同組換えクローンを得ることができた。このことは、相同組換えの効率が、ベクターの相同組換え領域の長さに強く依存することを示唆する。また、2.2 kbpの延長により、組み換え効率が大きく変化したことは、ES細胞中での相同組換えが起こるにはある種の閾値が存在するのかもしれない。

AQP4の遺伝子組み換え動物としては、CD-1系統の遺伝子背景を持つAQP4 null KOがすでに報告されている<sup>8)</sup>。このマウスをC57BL/6マウスに戻し交配すると聴覚の異常が認められた<sup>14)</sup>。このことは、AQP4は蝸牛に発現していることから説明されているが、一方で遺伝子背景が重要であることも示している。とりわけ、C57BL/6マウスに戻し交配することによりAQP4遺伝子の担う機能がより顕著になったことから、C57BL/6系統はAQP4遺伝子機能を解析するにあたって、優れた遺伝子背景だと考えられる。このため、脳高次機能におけるAQP4の機能解析を行うためには、本研究で樹立したAQP4-floxマウス系統が有用なツールとなる。この系統をC57BL/6系統の遺伝子背景を持つアストロサイト特異的Cre発現マウスと交配して得られるコンディショナルノックアウトマウスの解析はAQP4の脳機能における新たな知見を提供するだろう。

#### 謝 辞

ターゲッティングベクター作製を指導してくださった辻田実加さん、明石 馨さん、ES細胞培養を担当してくださった阿部 学さん、マイクロインジェクションを担当してくださった夏目理恵さん、直接御指導くださった崎村建司教授に深く感謝いたします。

#### 参 考 文 献

- 1) Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A and Nielsen S: Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542: 3-16, 2002.
- 2) Amiry - Moghaddam M and Ottersen OP: The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 4: 991-1001, 2003.
- 3) Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A and Fujiyoshi Y: Structural determinants of water permeation through aquaporin - 1. *Nature* 407: 599-605, 2000.
- 4) Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry - Moghaddam M, Bourque C, Agre P and Ottersen OP: Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high - resolution immunogold cytochemistry of aquaporin - 4 in rat brain. *J Neurosci* 17: 171-180, 1997.
- 5) Takumi Y, Nagelhus EA, Eidet J, Matsubara A, Usami S, Shinkawa H, Nielsen S and Ottersen OP: Select types of supporting cell in the inner ear express aquaporin - 4 water channel protein. *Eur J Neurosci* 10: 3584-3595, 1998.
- 6) Nagelhus E A, Veruki M, Torp R, Haug FM, Laake JH, Nielsen S, Agre P and Ottersen OP: Aquaporin - 4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci* 18: 2506-2519, 1998.
- 7) Frigeri A, Gropper MA, Umenishi F, Kawashima M, Brown D and Verkman AS: Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *J Cell Sci* 108 (Pt 9): 2993-3002, 1995.
- 8) Ma T, Yang B, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ and Verkman AS: Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial - insensitive water channel aquaporin - 4. *J Clin Invest* 100: 957-962, 1997.
- 9) Sternberg N and Hamilton D: Bacteriophage P1 sitespecific recombination. I. Recombination between loxP Sites. *J Mol Biol* 150: 467-486, 1981.
- 10) Yanagawa Y, Kobayashi T, Ohnishi M, Kobayashi T, Tamura S, Tsuzuki T, Sanbo M, Yagi T, Tashiro F and Miyazaki J: Enrichment and efficient screening of ES cells containing a targeted mutation: The use of DT - A gene with the polyadenylation signal as a negative selection marker. *Transgenic Res* 8: 215-221, 1999.
- 11) Kitayama K, Abe M, Kakizaki T, Honma D,

- Natume R, Fukaya M and Sakimura K: Purkinje Cell - Specific and Inducible Gene Recombination System Generated from C57BL/6 Mouse ES cell. *Biochem Biophys Res commun* 281: 1134 - 1140, 2001.
- 12) Nagasawa M, Sakimura K, Mori K J, Bedell M A, Copeland NG, Jenkins NA and Mishina M: Gene structure and chromosomal localization of the mouse NMDA receptor channel subunits. *Mol Brain Res* 36: 1 - 11, 1996.
- 13) Nakamura K, Manabe T, Watanabe M, Mamiya T, Ichikawa R, Kiyama Y, Sanbo M, Tagi T, Inoue Y, Nabeshima T, Mori H and Mishina M: Enhancement of hippocampal LTP, reference memory and sensorimotor gating in mutant mice lacking a telencephalon - specific cell adhesion molecule. *Eur J Neurosci* 13: 179 - 189, 2001.
- 14) Li J and Verkman AS: Impaired hearing in mice lacking aquaporin - 4 water channels. *J Biol Chem* 276: 31233 - 31237, 2001.

(平成 17 年 1 月 21 日受付)

---