

すが い ち あき

氏 名 菅 井 智 昭  
学 位 博 士 (医 学)  
学 位 記 番 号 新大院博(医)第1178号  
学 位 授 与 の 日 付 平成17年 3月23日  
学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当  
博 士 論 文 名 アクアポリン4遺伝子欠損誘導型マウスの作成

論文審査委員 主査 教授 中 田 力  
副査 教授 崎 村 建 司  
副査 教授 那 波 宏 之

#### 博士論文の要旨

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。水を選択的に通過させるチャネル、アクアポリン(AQP)の存在が近年明らかになり、細胞膜における水輸送の分子基盤が与えられた。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が、神経系で発現する主要な分子は AQP4 である。本研究ではアストロサイトに多く発現する 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 Cre/loxP システムによるコンディショナルターゲティング法を適用できる標的マウスを作成することにした。

まず、C57BL/6 マウス cDNA ライブラリーから得たプローブを用い、C57BL/6 マウスゲノムライブラリーをスクリーニングして、ターゲティングベクター作成に必要な遺伝子領域を含むクローン( $\lambda$ 14-1,  $\lambda$ 411-1)をクローニングした。これら取得したクローンを用い、相同組み換えのためのターゲティングベクターを作成した。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 1kbp PstI-XhoI フラグメントをクローン p14-1 より作成し、2つの loxP 配列の間に挿入することで Cre により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 4.5kbp 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。これを直線化し、C57BL/6 ES 細胞へのエレクトロポレーションを行い、ネオマイシン(neo)耐性の 820 クロウンをサザン解析によりスクリーニングしたが、陽性クローンは得られなかった。そこで、tvAQP4-flox1 の3'相同組換え領域を 2.2kbp 延長した tvAQP4-flox2 を新たに作成した。このベクターをエレクトロポレーションし 651 の neo 耐性クローンをスクリーニングすることで、最終的に標的遺伝子組み替えを起こした3つの ES 細胞クローンを同定した。これらの ES 細胞クローンを用いてキメラマウスを作出し、キメラ率の高い個体と C57BL/6 を交配することにより F1 個体を得た。F1 の遺伝子型解析の結果、変異アレルの生殖系列伝達が確認され、これらのマウスを C57BL/6 と交配させ、AQP4-flox マウス系統を樹立した。

次に AQP4-flox マウスを全身で Cre リコンビネースを発現する TLCN-Cre マウスと交配した。得られた仔の遺伝子型解析の結果、標的遺伝子配列をヘテロ欠損したマウスが同定された。このことから、作成した AQP4-flox マウスは、当初計画したとおり Cre 活性依存的に標的遺伝子配列を欠損することが証明された。

本研究では、AQP4の機能ドメインであるアルギニン-プロリン-アラニン(NPAモチーフ)をコードするエクソンをCre依存的に欠損できるAQP4-flox マウス系統を樹立した。したがって、この変異マウスとCreをアストロサイトで発現するマウスを交配することにより、アストロサイトでのみAQP4を欠失したマウス個体を作成することが可能になった。このことは、脳におけるAQP4の機能解析に非常に有用なツールを提供できることを意味する。本研究では、ES細胞で相同組換えを行うために相同組換え領域の長さが異なる2つのベクターを用いた。その結果、ES細胞中での相同組換えを起こすには、相同組み換え領域の長さにある種の閾値が存在することが示唆された。また、すでに報告のあるCD1系統の遺伝子背景をもつAQP4 null KOの解析から、C57BL/6マウスへの戻し交配によって聴覚の異常が亢進することが分かっており、C57BL/6系統はAQP4の機能解析に適していると考えられる。本研究で樹立したAQP4-flox マウスはC57BL/6由来ES細胞を用いており、AQP4の脳機能解析に優れたものであるといえる。

## 審査結果の要旨

本論文は、脳に多く発現する水チャネル、アクアポリン(AQP)4をCre/loxPシステムによりコンディショナルに欠損できるマウスの作成を記述したものである。C57BL/6マウスcDNAライブラリーから得たプローブを用い、C57BL/6マウスゲノムライブラリーをスクリーニングして、ターゲティングベクター作成に必要な遺伝子領域をクローニングした。次に取得したクローンを用い、相同組換えターゲティングベクターを作成した。C57BL/6ES細胞へこのベクターを導入し、最終的に標的遺伝子組換えを起こした3つのES細胞クローンを同定した。これらのES細胞クローンを用いてキメラマウスを作成し、変異アレルが生殖系列伝達するAQP4-floxマウス系統を樹立した。次にAQP4-floxマウスを全身でCreリコンビネースを発現するTLCN-Creマウスと交配し、ノックアウトマウスを作成した。本研究で樹立したAQP4-floxマウスにより、AQP4が脳において担う機能を解析できる道が拓けた。この点に本論文の学位論文としての価値を認める。