

小脳バーグマングリア選択的 Cre 発現マウス (Sept4-iCre) の作製と解析

彭 菲

新潟大学大学院医歯学総合研究科
分子細胞医学専攻細胞神経生物学分野
(主任：崎村建司教授)

Generation and characterization of Sept4-iCre knock-in mouse line for Bergmann
glia-selective Cre/loxP recombination.

Peng Fei

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science
Course for Molecular and Cellular Medicine
Cellular Neurobiology
(Director: Prof. Kenji Sakimura)

別刷請求先：〒951-8585

新潟市中央区旭町通 1-757

新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野

彭 菲

Reprint requests to: Peng Fei

Department of Cellular Neurobiology

Brain Research Institute, Niigata University

1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,

Niigata 951-8585 Japan

[要旨]

小脳は整然とした神経回路網を持ち、可塑性メカニズム原理解明のモデルとして広範な研究がおこなわれてきた。近年神経の可塑性が、非神経細胞であるグリア細胞によって制御されることが注目され、小脳においてもバグマングリア細胞が平行線維とプルキンエ細胞シナプスの形成と維持に必要であることが示されている。本研究の目的は、小脳機能におけるグリア細胞の役割を分子レベルで解明するツールとして、バグマングリア細胞選択的にコンディショナルノックアウトを惹起できる Cre リコンビナーゼドライバーマウスを開発することである。また併せて、Cre/loxP 組換えを感度良くモニターできるレポーターマウスを開発することである。

Cre ドライバーマウス作製のため、当該細胞に選択性高く発現する *Sept4* 遺伝子の開始メチオン部位に Codon-improved Cre (iCre) 遺伝子を挿入するノックイン法によりマウスを作製した。一方、レポーターマウスは、CAG プロモーターで tdTomato を発現するカセットを *Rosa26* 遺伝子座に挿入するノックイン型トランスジェニック法で作製した。これらのマウスを作製するために 2 種類のターゲティングベクターを構築し、C57BL/6N 由来 ES 細胞に導入して得られた組換えクローンより *Sept4*-iCre ノックインマウスと tdTomato レポーターマウスを樹立した。

これらの二重ヘテロ変異マウスの小脳皮質での tdTomato の発現を免疫組織化学的に検討したところ、プルキンエ細胞のマーカー分子とは tdTomato のシグナルは全く一致せず、バグマングリアに発現する分子とはシグナルが良く一致した。また、顆粒細胞層にはほとんどシグナルが認められなかった。以上の結果より、*Sept4*-iCre マウスの小脳皮質における Cre 活性はバグマングリアに極めて選択性が高いことが示唆された。

本研究において樹立した *Sept4*-iCre マウスと、様々な遺伝子の floxed 変異マウスとの交配によって、バグマングリア選択的コンディショナルノックアウトマウスが作製でき、その生理機能解析が可能になる。また、新規に樹立した tdTomato レポーターマウス系統は、マウス生体内における Cre リコンビナーゼ活性の検出に有用であることが示された。

キーワード：バグマングリア, Cre/loxP 組換え系, ノックインマウス, *Sept4* 遺伝子, C57BL/6N 系統

[緒言]

小脳は厳密にプログラムされた回路発達を通じて整然とした神経回路網を構築し、主に生体の運動機能を制御している。また、長期抑制に代表される小脳皮質でのシナプス伝達の可塑性は、記憶学習など脳機能の分子基盤解明を目的として盛んに研究が行われてきた¹⁾。一方最近では、発生期ならびに成熟期における脳神経の可塑性が、非神経細胞であるグリア細胞によって制御されることが注目されている²⁾。小脳皮質にはグリア細胞の一種であるバグマングリアが存在しており、小脳発達期では細胞移動および層構造形成³⁾⁴⁾、成体では神経伝達物質グルタミン酸の取り込みとシナプス伝達の調節に関与していると考えられている⁵⁾。さらに近年、この細胞で発現している AMPA 型グルタミン酸受容体はカルシウムイオン透過性であり、その流入が阻害されると平行線維-プルキンエ細胞シナプスに障害が起こることから、当該シナプスの保持にも関与することが示されている⁶⁾。しかしながら、バグマングリアの関与するこれらシナプス制御機構の分子機序は未だ大部分が不明であることから、Cre/loxP 組換え系を用いて、バグマングリア選択的な機能分子の遺伝子欠損動物（コンディショナルノックアウトマウス）を創出することが必要であると考えられた。そこで本研究では、バグマングリアで高発現する重合性グアノシン三リン酸結合蛋白質ファミリーであるセプチンの一種、Sept4 遺伝子⁸⁾に着目し、バグマングリア選択的に Cre リコンビナーゼを発現するドライバーマウスの作製を試みた。細胞種選択的遺伝子発現マウス作製法は数種類存在し、目的細胞に特異的に発現する遺伝子プロモーターを用いたトランスジェニック法が一般的であるが、遺伝子挿入部位を選択できないトランスジェニック法で作製されたマウスではしばしば異所性の発現がおこり、目的とする系統を得られる確率が低い傾向にある。そこで本研究においては、標的遺伝子の発現パターンを反映する可能性が高いノックイン法を適用した⁹⁾。一方、Cre/loxP 組換え系では、バクテリオファージ P1 由来の Cre が汎用されているが、哺乳動物とはコドン使用頻度が異なる上に、その配列中には CpG ジヌクレオチドが高頻度に存在しており、DNA メチル化を介した発現抑制を受ける可能性が指摘されている。この点については、哺乳動物のコドンに最適化するとともに、CpG 配列を最小化された Cre (iCre, Codon-improved Cre)が開発されている¹⁰⁾。これらの研究背景に基づき、本研究では、Sept4 遺伝子プロモーター制御下に Cre を発現することにより、バグマングリア選択性を示す Cre ドライバーマウス (Sept4-iCre ノックインマウス

ス) の作製を試みた。また、バグマンガリア選択的な Cre の発現を可視化するために、ノックイン型トランスジェニック法¹¹⁾を用いて、赤色蛍光タンパク質 tdTomato が発現するレポーター遺伝子を *Rosa26* 遺伝子座に導入した。この新規レポーターマウスと Sept4-iCre マウスの交配を通じて、バグマンガリア選択的なドライバーマウスとしての有用性を評価した。

[材料と方法]

1. 遺伝子改変マウス作製

動物を用いた全ての実験は、新潟大学動物実験倫理委員会と遺伝子組換え実験安全委員会の許可のもと、そのガイドラインに沿っておこなった。

ターゲティングベクターの構築は Quick and Easy BAC modification Kit (Gene Bridges)及び MultiSite Gateway テクノロジー (Life Technologies)を用いて行った。ノックイン法では、ゲノム配列にコードされる内在遺伝子を標的としてその開始メチオニンに発現させる遺伝子のフレームを合わせて挿入する。Sept4-iCre ノックインマウス作製のため、BAC クローン RP23-21N23 より、Sept4 遺伝子のエクソン 1 に存在する開始メチオニンより 5'側 6.8 kb、3'側 9.5 kb を含む 16.3 kb のゲノム配列を pMC-DT#3¹²⁾にクローニングした。さらに 4.6 kb からなる iCre-IRES-flag-EGFP- FRTpgkgb2Neo カセット (各構成要素については図 1 において示す)を、5'末端側に 5'- GAG ATA AAG TTA GAC CTA GAG CGT GCT GAC AGG GGT CTC AAG TGT GGG GC -3'、3'末端側に 5'- CTT ACC CCA GCT TCA GTC CCG TCC TCG GGG ACA GAG TTC CCT TGC CAT CC-3' を付加して PCR により増幅し、Sept4 遺伝子座へノックインすることでターゲティングベクターとした。また、tdTomato レポーターマウス作製のため、BAC クローン RP23-244D9 より、*Rosa26* 遺伝子座のエクソン 1 の下流約 1kb に存在する XbaI サイトから 5'側 4.7 kb を含むゲノム配列を pD5DE-2¹²⁾へ、3'側 5.2 kb を含むゲノム配列を pD3UE-2¹²⁾へクローニングした。さらに pDME-1¹²⁾へ CAG プロモーター、floxed STOP カセット、tdTomato 遺伝子配列、及びβグロビン遺伝子ポリ A 付加シグナルを連結し、5'側及び3'側ゲノム配列と pDEST-DT¹²⁾を LR クロナーゼ反応で連結することでターゲティングベクターとした。

各遺伝子の相同組換え ES 細胞クローンを得るため、2.5 pmol のターゲティングベクターを制限酵素で直鎖化した後、 8×10^6 個の C57BL/6N 系 ES 細胞⁷⁾を 500 μ l の HEPES 緩衝生理食塩水に混和し、Gene Pulser Xcell (BioRad) を用

いた電気穿孔法（間隙 4 mm, 200 V, 250 μ F）によってベクターを導入した。細胞をベクター導入後 2 日から 7 日まで 175 μ g/ml G418 含有培地中で選別し、育成した G418 耐性クローンを単離培養し、その一部を凍結保存、一部から抽出したゲノム DNA を用いてサザンブロット法によりその遺伝子型を解析した。5'側及び 3'側プローブと Neo プローブそれぞれで正しく組換えが起こっていることを確認し、各ノックイン変異の相同組換えクローンを、マイクロインジェクション法により ICR マウスの 8 細胞期胚に注入してキメラ胚を作製し、桑実胚もしくは胚盤胞まで発生させた後、精管結紮雄と交配させることにより、偽妊娠状態を誘起した ICR マウスの子宮内に移植し、キメラマウスを出産させた。性成熟を迎えたキメラ率の高い雄マウス（8 週齢以降）と ICR マウスを交配させ生殖系列伝達を確認した後、当該雄キメラマウスを雌 C57BL/6N マウス（日本チャールスリバー）と交配させ、各遺伝子改変マウス系統を樹立した。

2. マウスの交配と遺伝子型判定

樹立した Sept4-iCre ノックインマウスと CAG-floxed STOP-tdTomato/ROSA26 マウス（以下、tdTomato レポーターマウス）と交配させ、両者の遺伝子をヘテロに持つ個体を選別した。なお、tdTomato レポーターマウスの遺伝子型判定は、尻尾より抽出したゲノム DNA をサンプルとして、プライマーに 5' - AGT CGC TCT GAG TTG TTA TC -3'、5' - GGA TCT CAA GCA GGA GAG TA-3' 及び 5' - AGA AAA GCC TTG ACT TGA GG -3' を用いた PCR によって決定した。PCR 反応には KOD Dash ポリメラーゼ（東洋紡）を用い、反応液組成は製品プロトコールに準じた。PCR 反応条件は 98°C1 分、98°C15 秒-64°C2 秒-74°C30 秒を 3 サイクル、98°C15 秒-60°C2 秒-74°C30 秒を 5 サイクル、98°C15 秒-56°C2 秒-74°C30 秒を 27 サイクル、4°C保存とした。PCR 産生物を 0.5 μ g/ml エチジウムブロマイド含有 2%アガロースゲル（LO3：タカラバイオ）で泳動し、検出器（プリントグラフ（AE-6933）、アトー）を用いて検出した。

3. 組織学的解析

8-12 週齢の解析対象マウスをペントバルビタール麻酔下で開腹開胸後、心臓の右心耳に切れ目を入れ、左心室から体重（g）の約 2 倍容量（ml）の 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸バッファーで約 10 分間灌流固定し、脳を摘出後 1.0%アガロースに包埋しマイクロスライサーDTK-1000（DOSAKA EM）に

て 50 μm 厚の矢状断切片を作製し、蛍光顕微鏡により観察した。免疫組織染色には、1 次抗体として Car8 抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、北海道大学、渡辺雅彦教授より供与)、GFAP 抗体 (Dako、IR524)、DsRed 抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、Clontech、8370-2)、TARP γ -5 抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、北海道大学、渡辺雅彦教授より供与) を使用し、2 次抗体として抗ウサギ IgG-Alexa488 (1/200 希釈、Molecular probes、A11034)、および抗ウサギ IgG-Alexa594 (1/200 希釈、Molecular probes、A11037) を使用し、共焦点レーザー顕微鏡 FV300 (Olympus) により画像を取得した。

[結果]

1. Sept4-iCre ノックインマウスの作製

バーグマングリア選択的 Cre リコンビナーゼ発現マウス作製のため、ターゲティングベクターを構築した (図 1A)。電気穿孔法を用いて、このベクターを C57BL/6N 系 ES 細胞⁷⁾へ導入し、G418 耐性クローン 72 個の遺伝子型を解析した結果、目的の相同組換え体 16 クローンが得られ (図 1B)、クローン No.340-D11 より生殖系列伝達したキメラマウスを作製して Sept4-iCre ノックインマウス (以下、Sept4-iCre マウス) 系統を樹立することができた。Sept4-iCre マウスは Sept4 遺伝子の欠損が生じていると考えられるが、少なくともヘテロ変異では外見上および組織学的な異常は見出されず、生殖能力も野生型マウスとの差は認められなかった。Cre 発現細胞を可視化するために、iCre 遺伝子の下流には internal ribosome entry site (IRES) 配列と flag 配列付加 EGFP 遺伝子を連結させ、脳内における EGFP の蛍光発現領域を解析した。しかしながら、Sept4-iCre マウスの脳切片を蛍光顕微鏡で観察したところ、全ての脳領域において EGFP のシグナルは検出されなかった (データ非掲載)。後述の通り、Sept4-iCre マウスでは細胞種選択的な Cre 活性が認められるので Cre タンパクが発現していることは確実であるが、flag-EGFP については IRES 配列からの翻訳効率が低く、検出感度以下となった可能性が考えられる。

2. 新規 Cre レポーターマウスの作製

CAG-floxed STOP-tdTomato/Rosa26 マウス (以下、tdTomato レポーターマウス) 作製のためターゲティングベクターを構築した。(図 2A)。標的遺伝子座は外来遺伝子を導入するために一般的に使用される Rosa26 遺伝子座を使用した。また、レポーター遺伝子の発現量をより高くするために哺乳動物での遺伝子発現に実

績のある CAG プロモーターを連結し、Cre 活性による発現制御を可能とするためにプロモーターと tdTomato 遺伝子配列の間に floxed STOP カセットを挿入した。Sept4-iCre マウスと同様の手法で相同組換え体 2 クローンを得て (図 2B)、クローン No.360-C17 より tdTomato レポーターマウス系統を樹立することができた。このヘテロ変異マウスにおいても外見上の異常は見出されず、生殖能力も野生型マウスとの差は認められなかった。蛍光顕微鏡による tdTomato レポーターマウスの脳切片の観察では、全ての脳領域において tdTomato のシグナルは認められなかった (図 2C) ことから、哺乳動物細胞で強力に機能するとされている CAG プロモーターのプロモーター活性は、少なくとも Cre リコンビナーゼ非存在下では floxed STOP カセットによりほぼ完全に抑制されていると考えられる。また、ミクログリア選択的 Cre 発現マウスとして既に動作確認されている Aif1-iCre ノックインマウス (未発表データ) との交配により得られた二重ヘテロ変異マウスでは、tdTomato のシグナルは予想された通り Iba1 陽性ミクログリア選択的に検出されたが (図 2D)、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトには検出されなかった (データ非掲載)。以上の結果より、tdTomato レポーターマウスは Cre 活性を検出する新規レポーターマウスとして機能することが強く示唆された。

3. Sept4-iCre ノックインマウスの Cre 活性の検証

Sept4-iCre 系統と tdTomato レポーターマウスを交配し、得られた二重ヘテロ変異マウスの tdTomato 発現細胞について検討した。脳全体での観察 (図 3A) では、非染色切片での tdTomato の発現は小脳皮質に非常に強く、視床の一部 (図 3B) にも明瞭な発現が認められたが、他の脳領域では微弱または検出感度以下であった。視床の一部に認められる tdTomato の発現細胞はアストロサイト様の形態を示すが、現時点では正確な細胞種は不明である。なお、tdTomato タンパクを認識する DsRed 抗体により染色した場合、蛍光シグナルは増強されたが、発現パターン自体は変化しなかった (データ非掲載)。

さらに高倍率での観察から、小脳皮質ではプルキンエ細胞層に強いシグナルと、そこから分子層に向かって放射状に伸長する突起にシグナルが認められ、小脳顆粒細胞層にはシグナルは認められなかった (図 3C)。小脳皮質に存在する各細胞種のマーカー分子との局在性を免疫組織学的に検討したところ、プルキンエ細胞層においてプルキンエ細胞の細胞体のマーカーとなる炭酸脱水素酵

素関連タンパクの一種である Car8 と tdTomato のシグナルは全く一致せず (図 3D-F)、バグマングリアに強く発現する膜貫通型 AMPA 受容体調節タンパクの一種である TARP γ -5 とはシグナルが良く一致した (図 3G-I)。さらに、分子層の線維に認められる tdTomato のシグナルはプルキンエ細胞の樹状突起に存在する Car8 のシグナルと一致せず (図 3J-L)、アストロサイトのマーカーであるグリア細胞線維性酸性タンパク GFAP のシグナルと一致したことから (図 3M-O)、tdTomato のシグナルはバグマングリア由来の放射状線維に存在すると考えられる。以上の結果より、Sept4-iCre マウスの小脳皮質における Cre 活性はバグマングリアに極めて選択性が高いことが示唆された。

[考察]

本研究において樹立された Sept4-iCre マウス系統は、小脳皮質においてバグマングリアに選択性の高い Cre 活性を示すことから、バグマングリアに発現する様々な遺伝子の生理機能解析に有用なマウス系統となることが期待される。一例として、代表的な小脳皮質の興奮性シナプスである平行線維および登上線維-プルキンエ細胞間シナプスはバグマングリアに由来する放射状線維から突出した薄片状突起により被包され、そこに発現するグルタミン酸トランスポーターやカルシウムイオン透過性 AMPA 型グルタミン酸受容体によって局所的なシナプス電流が調節されると考えられているが⁶⁾、これらの分子機構の解明を目的として、バグマングリアに発現する関連分子の floxed 変異マウスとの交配によってコンディショナルノックアウトマウスを作製し解析することなどが考えられる。また、放射状線維は小脳発達期においては外顆粒層から内顆粒層へ移動する顆粒細胞の足場として機能すると考えられており⁴⁾、プルキンエ細胞の樹上突起もその線維に沿って伸展することから³⁾、樹上突起形成に何らかの機能を果たしていると考えられている。本研究においては Sept4-iCre マウスの発達段階での詳細な Cre 活性については検証していないが、GENSAT¹⁵⁾ (www.gensat.org/) により公開されている Sept4 遺伝子の BAC-EGFP 発現トランスジェニックマウス系統である Tg(Sept4-EGFP)AK193Gsat/Mmmmh では、生後 7 日齢の小脳においてもバグマングリア選択的な EGFP のシグナルが観察されている。このことから、Sept4-iCre マウスにおいても発生初期に Cre が発現する可能性があるため、小脳発達期のバグマングリアの担う機能の解析にも有用な系統となる可能性が示唆される。

本研究では未検証であるが、ノックイン変異の構造上、Sept4-iCre アレルでは Sept4 遺伝子がノックアウトされていると考えられる。既報の Sept4 ノックアウトマウスでは雄個体で精子の運動性低下による不妊が表現型として現れる¹³⁾。また、ドーパミン作動性神経伝達への影響と考えられる幾つかの行動学的変化が生ずることが明らかとなっている¹⁴⁾。しかしヘテロ変異マウスでは明らかな異常は認められないことから、Sept4-iCre マウスの場合もヘテロ変異で用いる限り、標的遺伝子のコンディショナルノックアウトに認められる表現型は原則的にその標的遺伝子の欠損に起因すると考えることが可能である。翻って、ホモ変異マウスはすなわち Sept4 ノックアウトマウスであるので、Sept4 遺伝子の生理機能解析に関しても有用な系統であると考えられる。

tdTomato レポーターマウス系統は、マウス生体内における Cre リコンビナーゼ活性の検出に有用であることが示された。Sept4-iCre マウス系統、tdTomato レポーターマウス系統とも、脳神経系の研究に適した C57BL/6N 系 ES 細胞より樹立することができた。それゆえ両系統とも、行動学的解析等を含む脳高次機能解析に戻し交配せずに使用可能であることは極めて重要な利点である。

[謝辞]

本研究の御指導をいただきました、新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野教授 崎村建司先生、准教授 阿部学先生に深謝致します。また遺伝子改変マウスの作製と解析にご協力いただきました新潟大学脳研究所プロジェクト研究分野 薄井宏先生、並びに新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野の皆様には感謝致します。

[文献]

- 1) Ito M: Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol.* 78: 272-303, 2006.
- 2) Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A: Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron.* 81: 728-39, 2014.
- 3) Yamada K, Watanabe M: Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int.* 77: 94-108, 2002.
- 4) Xu H, Yang Y, Tang X, Zhao M, Liang F, Xu P, Hou B, Xing Y, Bao X, Fan

- X: Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development. *Mol Neurobiol.* 47: 833-44, 2013.
- 5) Takayasu Y, Iino M, Takatsuru Y, Tanaka K, Ozawa S: Functions of glutamate transporters in cerebellar Purkinje cell synapses. *Acta Physiol (Oxf).* 197: 1-12, 2009.
 - 6) Iino M, Goto K, Kakegawa W, Okado H, Sudo M, Ishiuchi S, Miwa A, Takayasu Y, Saito I, Tsuzuki K, Ozawa S: Glia-synapse interaction through Ca²⁺-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science* 292: 926-9, 2001.
 - 7) Mishina M, Sakimura K: Conditional gene targeting on the pure C57BL/6 genetic background. *Neurosci Res.* 58: 105-12, 2007.
 - 8) Ageta-Ishihara N, Yamakado H, Morita T, Hattori S, Takao K, Miyakawa T, Takahashi R, Kinoshita M: Chronic overload of SEPT4, a parkin substrate that aggregates in Parkinson's disease, causes behavioral alterations but not neurodegeneration in mice. *Mol Brain.* 6: 35, 2013.
 - 9) Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, Yamanaka A: Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Rep.* 2: 397-406, 2012.
 - 10) Shimshek DR, Kim J, Hübner MR, Spergel DJ, Buchholz F, Casanova E, Stewart AF, Seeburg PH, Sprengel R: Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. *Genesis.* 32: 19-26, 2002.
 - 11) Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H: A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci.* 13: 133–140, 2010.

- 12) Kakegawa W, Mitakidis N, Miura E, Abe M, Matsuda K, Takeo YH, Kohda K, Motohashi J, Takahashi A, Nagao S, Muramatsu S, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR, Yuzaki M: Anterograde C1ql1 signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum. *Neuron*. 85: 316-29, 2015.
- 13) Ihara M, Kinoshita A, Yamada S, Tanaka H, Tanigaki A, Kitano A, Goto M, Okubo K, Nishiyama H, Ogawa O, Takahashi C, Itohara S, Nishimune Y, Noda M, Kinoshita M: Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. *Dev Cell*. 8: 343-52, 2005.
- 14) Ihara M, Yamasaki N, Hagiwara A, Tanigaki A, Kitano A, Hikawa R, Tomimoto H, Noda M, Takanashi M, Mori H, Hattori N, Miyakawa T, Kinoshita M: Sept4, a component of presynaptic scaffold and Lewy bodies, is required for the suppression of alpha-synuclein neurotoxicity. *Neuron*. 53: 519-33, 2007.
- 15) Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N: A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature*. 425: 917-25, 2003.

図1 Sept4-iCre ノックインマウスの作製

(A) 野生型 *Sept4* 遺伝子座のゲノム構造 (*Sept4*⁺)、相同組換え後のゲノム構造 (*Sept4*^{iCre}) の模式図。白四角は非翻訳領域、黒四角は翻訳領域のエクソンを示す。エクソン 1 の開始メチオニンにフレームを合わせ、Codon-improved Cre 遺伝子 (iCre)、Internal ribosome entry site (IRES)、flag 配列を付加した EGFP (flag-EGFP)、β グロビン遺伝子由来ポリ A 付加シグナル (pA)、両端に FRT 配列を付加した Neo 耐性遺伝子 (FRTpgkbg2Neo) を連結した。

(B) サザンブロットによる相同組換え ES 細胞クローンのスクリーニング。KpnI 消化された ES 細胞ゲノムは 5'プローブでは野生型で 13.6 kb、ノックイン変異で 9.1 kb のバンドが検出される。写真はスクリーニング結果の一部を示しており、10 クローン中、3 クローン (340-D11、340-D9、340-D6) がヘテロで相同組換えを生じている。

(C) サザンブロットによる相同組換えクローンの遺伝子型確認。BamHI 消化、3'プローブでは野生型で 17.1 kb、ノックイン変異で 15.7 kb のバンドが検出され、BamHI 消化、Neo プローブではノックイン変異で 15.7 kb のバンドが検出される。野生型 ES 細胞 (B6ES) は Neo 耐性遺伝子を有していない。クローン 340-D11 は正確な相同組換えクローンであり、ランダムなベクター挿入は生じていないことを示す。

図2 tdTomato レポーターマウスの作製

(A) 野生型 *Rosa26* 遺伝子のゲノム構造、ターゲティングベクター、相同組換え後のゲノム構造、Cre/loxP 組換え後ゲノム構造の模式図。CAG プロモーター (CAG prom.) の下流に loxP 配列 (赤三角) に挟まれた SV40 由来ポリ A 付加シグナル (2xpA)、Neo 耐性遺伝子 (P_{gk}-Neo)、STOP カセット (Stop cassette) を連結し、さらに tdTomato (tdT) とポリ A 付加シグナル (pA) を挿入した。Neo 耐性遺伝子の両端には FRT 配列が付加されている。

(B) サザンブロットによる相同組換えクロンの遺伝子型確認。MscI 消化された ES 細胞ゲノムは 5' プローブでは野生型で 15.8 kb、ノックイン変異で 9.5 kb のバンドが検出され、3' プローブでは野生型で 15.8 kb、ノックイン変異で 9.9 kb のバンドが検出される。BglI 消化、Neo プローブではノックイン変異で 11.3 kb のバンドが検出される。野生型 ES 細胞 (B6ES) は Neo 耐性遺伝子を有していない。クローン 360-C1 は正確な相同組換えクロンであり、ランダムなベクター挿入は生じていないことを示す。

(C) tdTomato レポーターマウス脳切片の蛍光顕微鏡観察像。全脳領域において tdTomato の発現は検出感度以下である。右上は tdTomato 同一切片の明視野全体像。

(D) Aif1-iCre ノックインおよび tdTomato レポーターの二重変異マウス脳切片、海馬近傍の蛍光顕微鏡観察像。Iba1 陽性ミクログリア選択的に tdTomato のシグナルが検出される。

図3 Sept4-iCre マウスにおける Cre 活性の検証

(A) Sept4-iCre ノックインおよび tdTomato レポーターの二重変異マウス脳切片の蛍光観察像。(A)の視床部分の拡大像 (B) および小脳の拡大像 (C) を示した。小脳皮質に強く、視床に弱い tdTomato の蛍光シグナルが検出される。

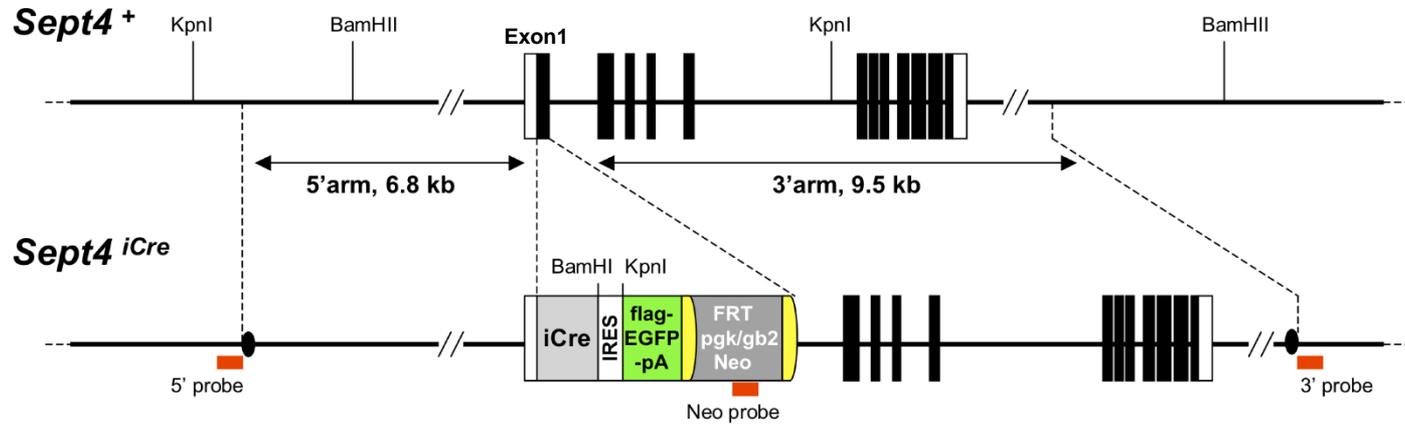
(D-F) 共焦点レーザー顕微鏡によるプルキンエ細胞マーカーの Car8 抗体による蛍光染色 (D) と tdTomato (E) の二重蛍光観察像 (F)。

(G-I) 共焦点レーザー顕微鏡による、バーグマングリア細胞体マーカーの TARP γ -5 抗体による蛍光染色 (G) と tdTomato (H) の二重蛍光観察像 (I)。

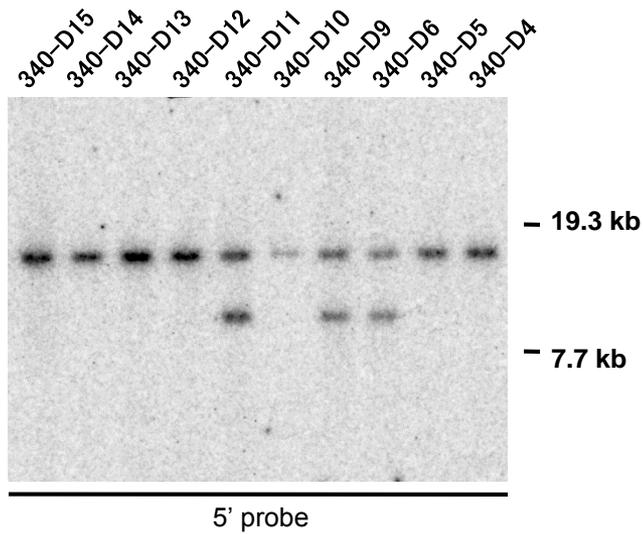
(J-L) 共焦点レーザー顕微鏡による Car8 抗体による蛍光染色 (J) と tdTomato (K) の二重蛍光観察像 (L)。

(M-O) 共焦点レーザー顕微鏡によるアストロサイトのマーカーの GFAP 抗体による蛍光染色 (M) と tdTomato (N) の二重蛍光観察像 (O)。

A



B



C

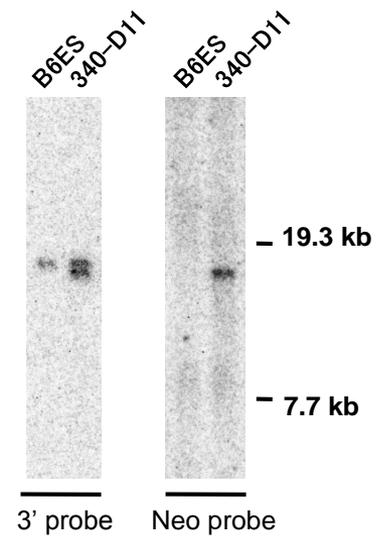


図1. Sept4-iCreノックインマウスの作製

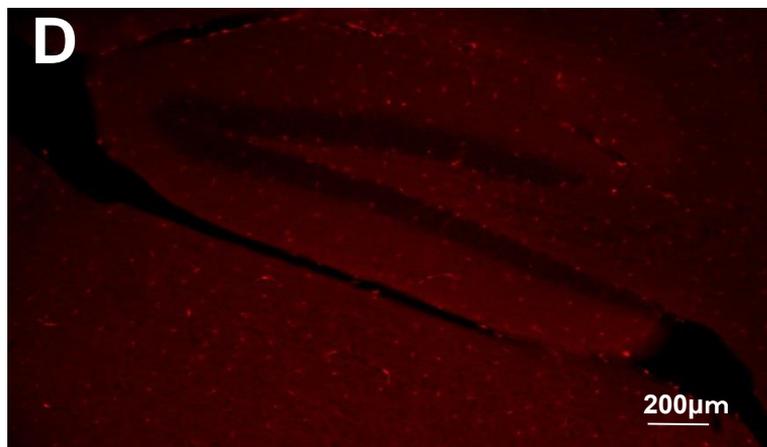
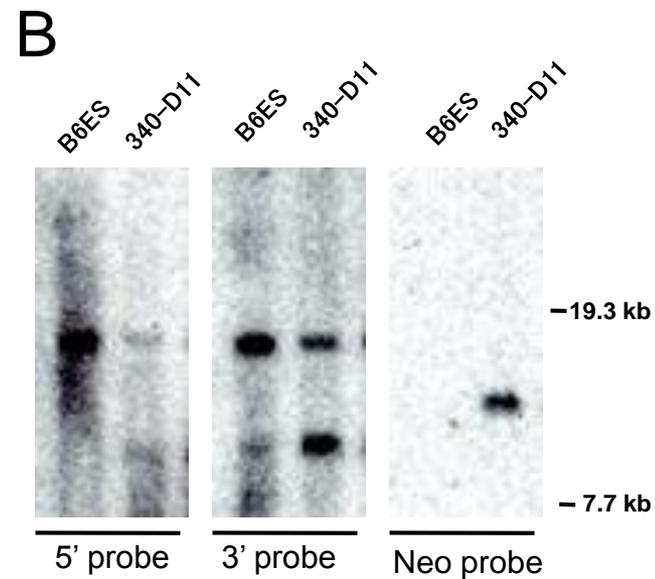
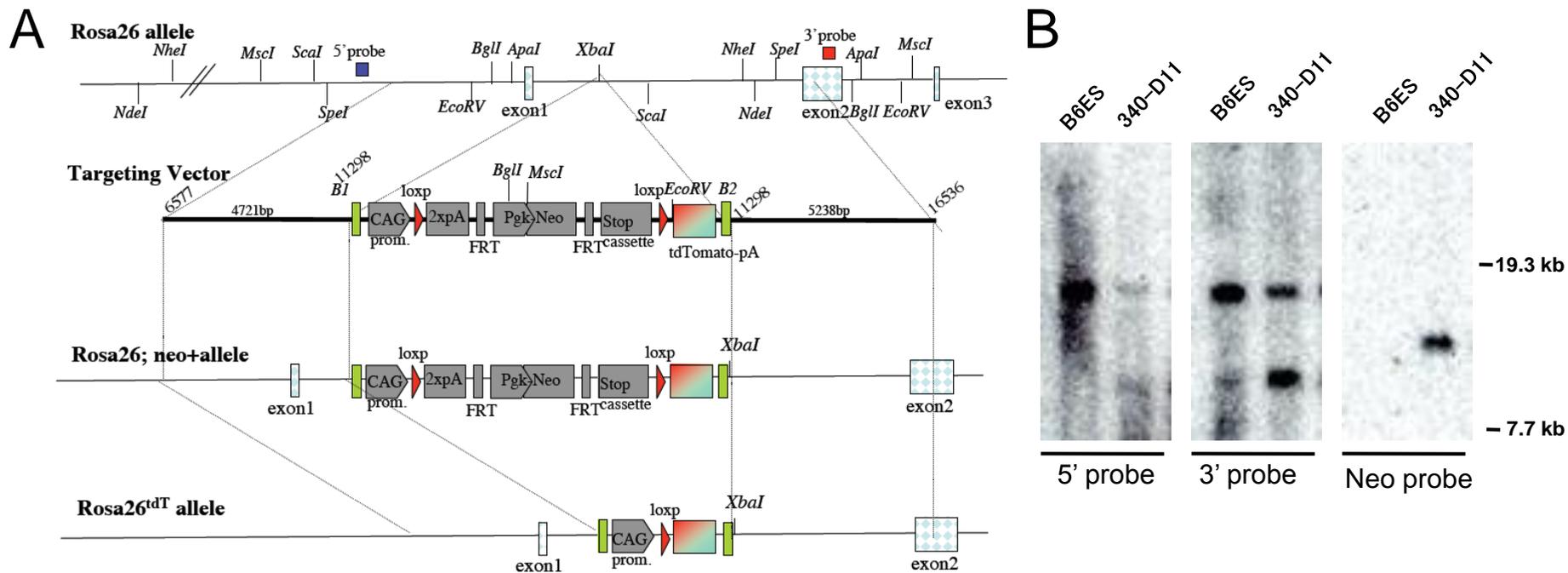


図2. tdTomatoレポーターマウスの作製

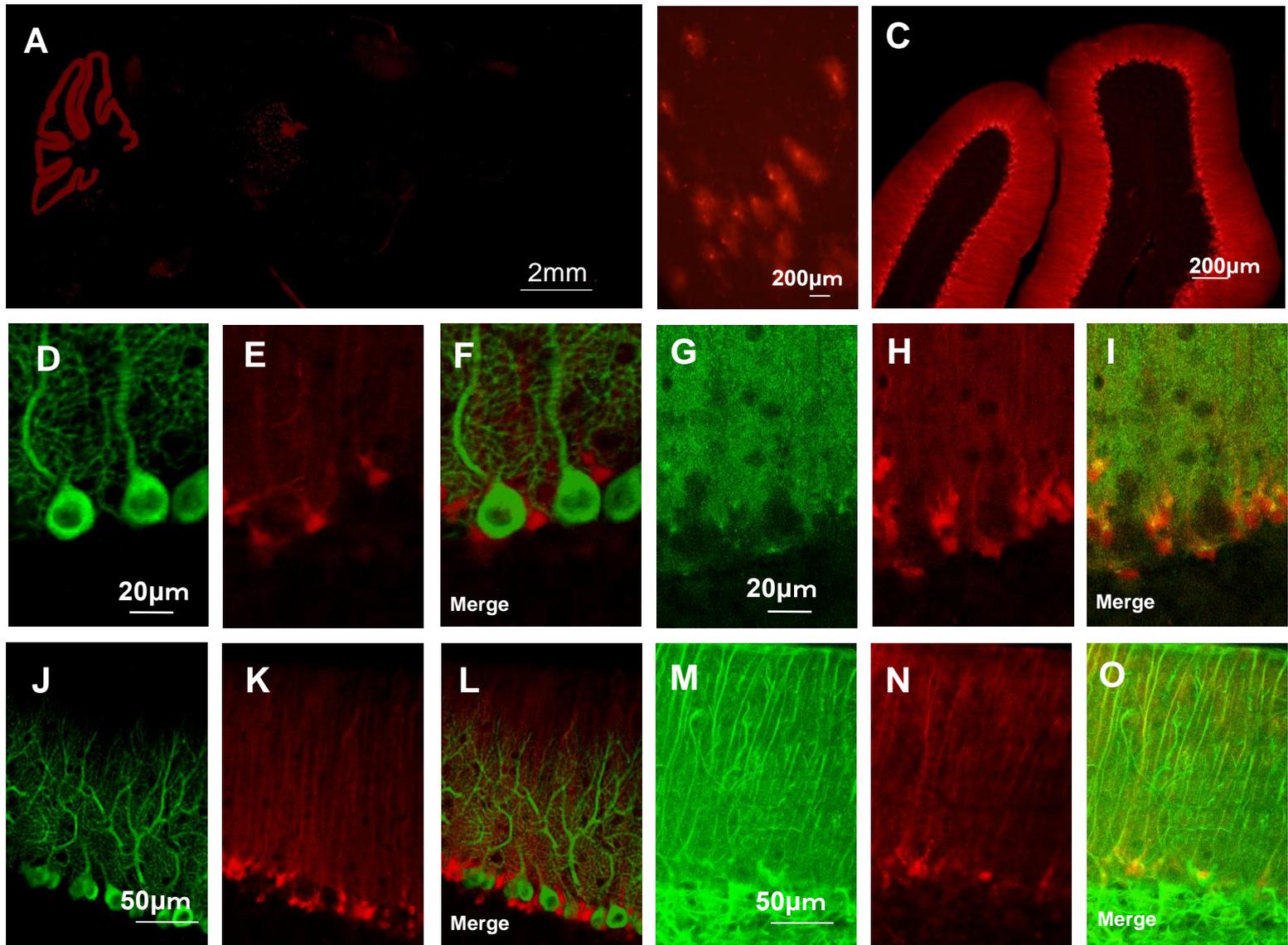


図3. Sept4-iCreマウスにおけるCre活性の検証