

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 彭 菲  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 649 号  
学位授与の日付 平成 27 年 9 月 24 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 小脳バーグマンングリア選択的 Cre 発現マウス (Sept4-iCre) の作製と解析

論文審査委員 主査 教授 竹林 浩秀  
副査 教授 崎村 建司  
副査 教授 那波 宏之

### 博士論文の要旨

#### 【背景と目的】

小脳は、整然とした神経回路網をもち、主に生体の運動機能を制御していると考えられている。小脳はその構造が単純で構成する細胞種の数が少ないことから、神経系における可塑性メカニズム原理の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、発生期ならびに成熟期における神経細胞の可塑性が、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、小脳においてもバーグマン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、バーグマン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。

#### 【方法】

バーグマンングリア細胞選択的に Cre リコンビナーゼを発現させるため、当該細胞に選択的に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に属するセプチンタンパク質群の一種である Sept4 遺伝子に着目した。この遺伝子プロモーターで確実に Cre リコンビナーゼを発現させるために、Sept4 遺伝子のエクソン 1 に存在する開始メチオニン部位に Cre 遺伝子を挿入するノックインの手法を用いてマウスを作製した。まず 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#3 にクローニングした。さらに 4.6 kb からなる iCre-IRES-flag-EGFP-FRTpgk2Neo カセットを開始メチオニンにフレームを合わせて挿入し相同組換えベクターを構築した。一方マウス生体内での Cre 活性を高感度で検出するための新規 Cre レポーターマウスは、CAG プロモーターで赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現するカセットを特定の遺伝子部位に挿入するノックイン型トランスジェニック法で作製することにした。このために、ROSA26 遺伝子のエクソン 2 に存在する開始メチオニンから 5' 側 4.7 kb と 3' 側 5.2 kb を含むゲノム配列に CAG プロモーター、floxed STOP カセット、tdTomato 遺伝子配列、グロビン遺伝子 polyA 付加シグナルを連結したカセット

を挿入したターゲティングベクターを構築した。これらのベクターを C57BL/6N 由来 ES 細胞 RENKA に導入して組換えクローンを選択した後、それぞれの ES 細胞よりキメラマウスを作出した。当該遺伝子を生殖系列遺伝するキメラマウスより 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。

#### 【結果】

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結果、非染色切片での tdTomato の発現は小脳皮質に非常強く、視床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。さらに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。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質の一種である Car8 と tdTomato のシグナルは全く一致せず、バーグマングリア細胞に強く発現する膜貫通型 AMPA 型グルタミン酸受容体調節タンパク質の一種である TARP・-5 とはシグナルが良く一致した。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、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、tdTomato のシグナルはバーグマングリア細胞由来の放射状線維に存在すると考えられた。以上の結果より、Sept4-iCre マウスの小脳皮質における Cre 活性はバーグマングリアに極めて選択性が高いことが示唆された。

#### 【考察と結論】

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ーグマングリアに選択性の高い Cre 活性を示すことから、バーグマングリアに発現する様々な遺伝子の floxed 型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、その生理機能解析をすることが可能になった。なお Sept4-iCre アレルでは Sept4 遺伝子がノックアウトされているが、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。なお、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。これらのマウスは、脳神経系の研究に適した C57BL/6N 系 ES 細胞より樹立されており、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。

#### 審査結果の要旨

小脳は単純な構造で構成細胞種の数が少ないことから、神経可塑性メカニズムを解明するためのモデルとして広範な研究が行われている。小脳バーグマングリア細胞の機能を分子レベルで解明するツールとして、バーグマングリア選択的に遺伝子破壊を惹起する Cre ドライバーマウスの開発が待たれていた。

本研究では、バーグマングリアに高発現する Sept4 遺伝子座に Cre をノックインした Sept4-iCre マウスと、Cre 組換えにより赤色蛍光タンパク (tdTomato) を発現するレポーターマウスを作成した。交配により得られた二重ヘテロ変異マウスの中脳神経系において、レポーターは小脳皮質プルキンエ細胞層に非常に強く発現し、視床にも発現していた。細胞種特異的マーカーと tdTomato との免疫二重染色を行ったところ、プル

キンエ細胞マーカー(Car8)とは一致せず、バグマングリア細胞マーカー(TARP $\gamma$ -5)とは一致した。さらに、小脳皮質分子層の放射状線維においてアストロサイトマーカー(GFAP)のシグナルと一致した。以上の結果より、Sept4-iCre マウスの小脳における 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された。

近年、アストログリアのヘテロジェナイエティーは、注目を集めており、バグマングリア選択的 Cre ドライバーマウスの開発は小脳グリア細胞の研究を進める上で、大きな意義があると考えられる。また、最近の組織透明化技術の発達により、組織を透過しやすい赤色蛍光レポーターマウスは、組織の三次元構築を調べる上で有用なツールになることが期待される。以上の点に、本研究の学位論文としての価値を認める。