

# 運動ニューロン特異的遺伝子組み換え法の開発とその応用

## The Establishment of Motoneuron Specific Recombination System

研究代表者 岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 助手 竹林 浩秀

National Institute for Physiological Sciences

Okazaki National Research Institutes

Research Associate, Hirohide Takebayashi

### 和文アブストラクト

basic helix-loop-helix型転写因子のOlig2は、機能発現実験および機能喪失実験により、運動ニューロン・オリゴデンドロサイトの発生に必須の分子であることが示されている。本研究では運動ニューロンとオリゴデンドロサイトの発生機構をさらに詳細に解析するため、Olig2遺伝子座にタモキシフェン依存性Creリコンビナーゼ (CreER<sup>TM</sup>) を挿入したマウスと、loxP配列における組み換えによりマーカー遺伝子 (lacZ) を発現するレポーターマウスのダブルトランスジェニックマウスを作製し、Olig2陽性細胞において、時期特異的組み換えを誘導することを試みた。胎生期にタモキシフェンを投与することにより、このダブルトランスジェニックマウスでは、Olig2を発現している細胞で遺伝子組み換えを起こすことを証明した。このレポーター遺伝子発現は分裂後の細胞にも受け継がれるため、組み換え標識された細胞から派生した細胞も恒久的にラベルされる。現在、このマウスにおいて特定の時期に組み換えを起こし、Olig2陽性細胞からどのような細胞種が生まれるかについて詳細に検討している。

### Abstract

Gain-of-function and loss-of-function experiments demonstrated that a basic helix-loop-helix transcriptional factor, Olig2 is indispensable for generation of motoneurons and oligodendrocytes. In this study, to elucidate mechanism of motoneuron- and oligodendrocyte-development more precisely, we generated double-transgenic mouse by intercrossing Olig2 heterozygote mice, whose Olig2 locus was replaced with a fragment encoding tamoxifen-inducible Cre recombinase (CreER<sup>TM</sup>), and reporter mice, in which lacZ reporter gene is expressed by Cre-mediated recombination, and then attempted to induce time-specific recombination in Olig2-expressing cells. In these double-transgenic mice, we demonstrated that administration of tamoxifen induced reporter gene expression via Cre-mediated recombination only in Olig2-expressing cells at embryonic stages. Since this recombination is inheritable event, reporter gene expression permanently persists in the progeny of recombined cells. We are analyzing what kinds of cells are derived from Olig2-expressing progenitors by inducing recombination at various stages.

## 1. 研究目的

Olig ファミリーは、申請者のグループと外国の研究グループが独立に同定した新しい basic helix-loop-helix 型転写因子である。Olig1, Olig2 は当初オリゴデンドロサイト特異的な遺伝子として報告されたが、我々は Olig2 遺伝子が、運動ニューロンとオリゴデンドロサイトが発生してくる pMN ドメインに発現していること、発現時期がオリゴデンドロサイトの発生時期よりも早く発現し、それが運動ニューロンの発現時期に一致すること、などから運動ニューロンの分化にも関わっている可能性を見出した。実際、ニワトリの神経管において Olig2 を異所性に発現させると運動ニューロンが産生されることを示した。また、我々は Olig2 ノックアウトマウスを作成し、その解析をおこなったところ、ノックアウトマウスの脊髄では運動ニューロンおよびオリゴデンドロサイトが産生されず、出生直後に死亡することを発見した。このことから、Olig2 は運動ニューロンとオリゴデンドロサイトの発生に必須の因子であることが証明された。また、転写因子の発現パターン解析や異所性発現実験により、Olig2 はまず Ngn2 とともに働くことにより運動ニューロンを産生し、発生が進むと Nkx2.2 などの他の転写因子と共に働くことによりオリゴデンドロサイトを産生する、つまり、Olig2 遺伝子はニューロンとグリアへの分化スイッチの役割をもつことが明らかとなった。

我々は、運動ニューロン・オリゴデンドロサイト分化の分子メカニズムをさらに詳細に解析するために、CreR<sup>TM</sup>/loxP システムを用いて、任意の時期に Olig2 陽性細胞特異的な遺伝子組み換えを誘導するシステムを確立することを試みた。

## 2. 研究経過

### 2.1. ダブルトランスジェニックマウスの作製

我々は Olig2 ノックアウトマウスを作製する際、

Olig2 遺伝子座に CreER<sup>TM</sup>遺伝子を挿入したノックインマウスとして作製した。Cre リコンビナーゼは P1 バクテリオファージ由来の遺伝子組み換え酵素で、loxP という特定の遺伝子配列で挟まれた DNA を切り出し、その前後の配列をつなぎ合わせることで知られている。この活性はマウスのゲノム上に人為的に導入した loxP 配列に対しても同様に働く。今回は、この Cre リコンビナーゼの C 末に変異型エストロゲンレセプターのリガンド結合ドメインを融合した CreER<sup>TM</sup>を使用した。この CreER<sup>TM</sup>はエストロゲンアンタゴニストのタモキシフェン存在下でのみ活性化されるという特徴を持つ。この Olig2 ノックインマウスのヘテロ接合体と、Cre による組み換えを受けると lacZ 遺伝子が発現するレポーターマウスを交配することによって、ダブルトランスジェニックマウスを作製した(図1)。

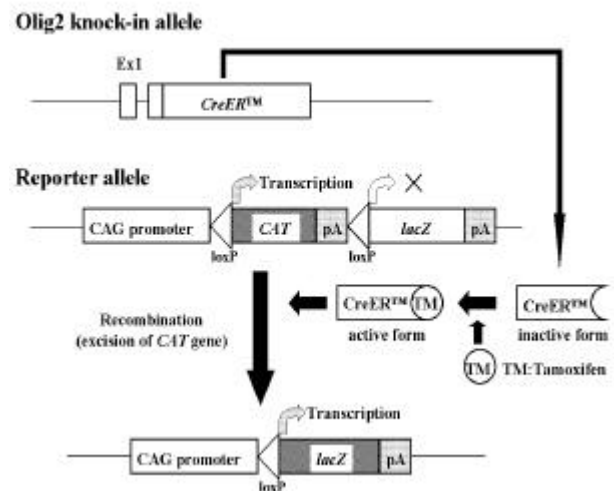


図1. 細胞系譜特異的・時期特異的組み換え機構

ダブルトランスジェニックマウスの Olig2 発現細胞で CreER<sup>TM</sup>が発現する。CreER<sup>TM</sup>はタモキシフェンと結合して活性化し、レポーターアレルの loxP 配列で挟まれた chloramphenicol acetyltransferase (CAT)遺伝子を切除する。組み換え後、マーカーの lacZ 遺伝子が発現する(レポーターマウス / CAG-CAT-Z は大阪大学・宮崎純一先生より供与された)。

このマウスでは Olig2 を発現する細胞で CreER<sup>TM</sup> が発現するが、そのままの状態では組み換え酵素活性をもたず、レポーターアリルは CAT 遺伝子を発現する。CreER<sup>TM</sup> はタモキシフェンと結合すると活性化し、レポーターアリル上の loxP 配列で挟まれた CAT 遺伝子を切り離す。その結果、マーカーの lacZ 遺伝子が発現する。今回用いた 4-水酸化タモキシフェンの生体内での半減期は約 48 時間以内と言われており、限られた期間内で Olig2 を発現している細胞のみで組み換えをおこなうことが可能である。組み換わったレポーターアリルは分裂後細胞にも受け継がれるので、タモキシフェン投与時の Olig2 陽性細胞や、そこから生じた娘細胞は恒久的に lacZ 遺伝子を発現する。また、これらの細胞は X-gal 染色により容易に識別できる。

## 2.2.胎生期におけるタモキシフェン誘導性時期特異的遺伝子組み換え

次に我々は、胎生期におけるタモキシフェン誘導性遺伝子組み換えが、実際に起こるかどうかを検討した。ダブルトランスジェニックマウスのオスを、野生型のメスと交配し（4分の1の確率でダブルトランスジェニックの胎児が得られる）、胎生 10.5 日に母体にタモキシフェンを 1.5mg 腹腔内投与し、2 日後にその胎児を取り出して、whole mount X-gal 染色をおこなった（図 2）。

運動ニューロンは胎生 9.5 日頃より、Olig2 陽性の pMN ドメインの脳室層から生じ、腹外側の前角に移動して集団を形成し、そこで成熟することが知られている。タモキシフェンを投与した胎児では、予想通り pMN ドメインと、運動ニューロンが存在する脊髄前角の運動ニューロンカラムが X-gal 陽性に染色された。一方、タモキシフェンを投与されていないダブルトランスジェニックの胎児では、X-gal 陽性の細胞は認められなかった。つまり、タモキシ

フェンによる誘導性は厳密に保たれていることがわかった。

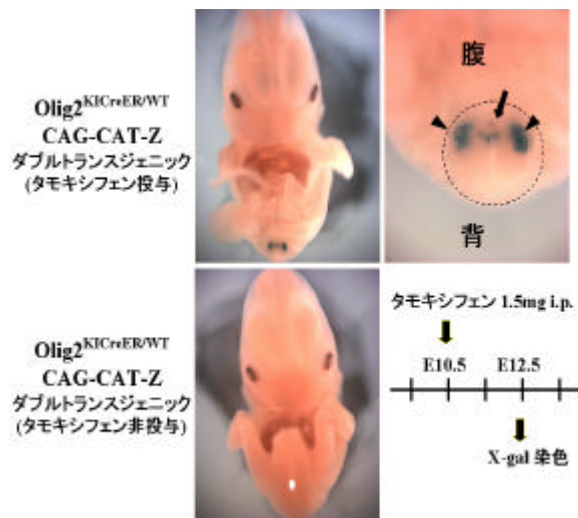


図 2. 時期特異的遺伝子組み換え

（上段）タモキシフェンを投与されたダブルトランスジェニックの胎児 点線:脊髄の輪郭, 矢印:pMN ドメイン, 矢頭:脊髄前角（左下）タモキシフェンを投与していないダブルトランスジェニックマウス（右下）タモキシフェン投与のスケジュール

## 3.研究成果

時期特異的に遺伝子組み換えをおこなす CreER<sup>TM</sup>/loxP システムを用いて、Olig2 発現細胞特異的にラベルできる実験系を確立した。

Olig2 遺伝子の細胞系譜解析としては、別のグループによる Olig2 遺伝子座にノックインした GFP をマーカーとして使用した短期的な細胞系譜追跡実験があるが、本研究のような、恒久的に細胞をラベルする長期的な細胞系譜追跡実験はなされていない。オリゴデンドロサイトとアストロサイトの共通の前駆細胞 (glia restricted progenitor) の in vivo での存在の有無が大きな論争になっているが、その問題に答えるためにも本システムを確立した意義は大きい。

#### 4.今後の課題と発展

本研究により、胎生期で遺伝子組み換えを起こすことを示したが、今後は、成体を含め、さらに発生の進んだ段階での陽性細胞の解析を行い、Olig2 陽性細胞から最終的にどのような細胞が生じてくるのかを解明したいと考えている。タモキシフェンの投与時期を変更することにより、ラベルされる細胞種の変化を調べ、特定の時期における Olig2 陽性細胞の *in vivo* での分化能を明らかにできる。さらに、Olig2 ノックアウトマウスの脊髄では、運動ニューロンとオリゴデンドロサイトが全く存在しないが、本来それらになるはずであった細胞は死滅するわけではなく、アストロサイトなど別の細胞種に運命転換することがわかっている。このダブルトランスジェニックマウスを、Olig2 ヘテロ接合体と掛け合わせるにより、Olig2 ノックアウトマウスでの pMN ドメインの細胞系譜解析を行うことも可能である。

また、上記の細胞系譜追跡実験以外にも、任意の時期に遺伝子組み換えを起こすことができるこのシステムの特徴を利用して、発生の初期に致死となる遺伝子の働きを解析する際に、ある程度発生が進んだ段階で、細胞系譜特異的・時期特異的に遺伝子ノックアウトを行うといった利用法も考えられる。

これらの実験を通して得られた知見から、運動ニューロンやオリゴデンドロサイトの発生機構の解明に近づくことができれば、筋萎縮性側索硬化症や多発性硬化症といった運動ニューロンやオリゴデンドロサイトの異常が原因となる難治性疾患の治療や、神経再生への手掛かりをつかめるものと期待している。

#### 5.発表論文リスト

1. The basic helix-loop-helix factor Olig2 is essential for development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. Takebayashi H., Nabeshima Y., Yoshida S., Chisaka O., Ikenaka K., Nabeshima Y. *Current Biology*, 2002 12: 1157-1163.
2. Lineage-tracing experiments on Olig2-positive cells. Masahira N., Takebayashi H., Ding L., Shimizu K., Nabeshima Y., Ikenaka K. *in preparation*