

神経系各種活性物質の機能解析のための
プログラムドノックアウトマウスの作成系の開発

(07557183)

平成7年度～平成9年度科学研究費補助金（基盤研究（A）（1））研究成果報告書



平成10年3月

研究代表者 木山 博資

(旭川医科大学医学部教授)

はしがき

本報告書は平成7年度～平成9年度に渡って研究代表者：木山博資らが研究課題「神経系各種活性物質の機能解析のためのプログラムドノックアウトマウス作成系の開発」のために受領した文部省科学研究費補助金（試験研究B／基盤研究A）によって行われた研究の報告である。なを、平成7年度時点では本研究は試験研究Bであったが、制度の変更により最終年度は基盤Aとなっていること。また、研究代表者が平成9年2月16日より大阪大学医学部助教授から旭川医科大学教授へ昇任したため、所属機関の変更が平成9年にあったこと。さらに、これにともない平成9年度の研究分担者は加藤英政（現：旭川医科大学医学部助手）のみであったことを申し添える。

以下、研究内容の詳細に入る前に、研究組織・研究経費・研究発表等について記載する。

研究組織

研究代表者：木山 博資（旭川医科大学医学部教授）平成7～9年度
研究分担者：田賀 哲也（大阪大学細胞工学センター助手）平成7～8年度
研究分担者：加藤 英政（旭川医科大学医学部助手）平成7～9年度
研究分担者：今泉 和則（田辺製薬(株) 研究員）平成7年～8年度
研究分担者：津田 学（田辺製薬(株) 研究員）平成7年～8年度

研究経費

平成7年度	7,800千円
平成8年度	3,000千円
平成9年度	2,700千円
計	13,500千円

研究発表

(1)学会誌等

1. Kiryu S, Morita N, Ohno K, Maeno H, Kiyama H, (1995) Regulation of mRNA expression involved in Ras and PKA signal pathways during rat hypoglossal nerve regeneration. *Mol. Brain Res.* 29:147-156.
2. Imaizumi K, Katoh T, Tsuda M, Takagi T, Kiyama H, (1995) GAP-43 mRNA suppression by the ribozyme in PC12 cells and inhibition of evoked dopamine release. *Mol. Brain Res.* 32:338-341.
3. Kiryu S, Yao GL, Morita N, Kato H, Kiyama H (1995) Nerve injury enhances rat neuronal glutamate transporter expression: identification by differential display PCR. *J. Neurosci.* 15: 7872-7878.

4. Morita N, Kiryu S, Kiyama H (1996) p53 independent cyclin G expression in a group of mature neurons and its enhanced expression during nerve regeneration. *J. Neurosci.* 16:5961-5966.
5. Hirota H, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T (1996) Accelerated nerve regeneration in mice by upregulated expression of IL-6 and IL-6 receptor after trauma. *J. Exp. Med.* 183:2627-2634.
6. Watanabe D, Yoshimura R, Khalil M, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T, Kiyama H (1996) Characteristic localization of gp130 (the signal transducing receptor component used in common for IL-6/LIF/ IL-11/ CNTF/ OM) in the rat brain. *Eur.J. Neurosci.* 8: 1630-1640.
7. Morita N, Takumi T, Kiyama H (1996) Distinct localization of two serine/ threonine kinase receptors for activin and TGF- β in the rat brain and transient down-regulation of Type I activin receptor during peripheral nerve regeneration. *Mol. Brain Res.* 42:263-271.
8. Yao GL, Kato H, Khalil M, Kiryu S, Kiyama H. (1997) Enhancement in expression of cytokine receptor and its intracellular signaling molecules after peripheral nerve injury. *Eur. J. Neurosci.* 9:1047-1054.
9. Su QN, Namikawa K, Toki H, Kiyama H (1997) Differential display revealed transcriptional upregulation of the motor molecules for both anterograde and retrograde axonal transport during nerve regeneration. *Eur. J. Neurosci.* 9:1542-1547.
10. Oshige-Hayashi Y, Kiyama H. (1997) Expression of Glycine max (soybean agglutinin: SBA) binding molecule in injured motoneurons and its specific localization in the extracellular matrix between injured neurons and microglia. *Neurosci. Res.* 27:271-275.

口頭発表

- 1) 木山博資、桐生寿美子、守田直規、第101回日本解剖学会総会シンポジウム、ニューロンとグリアの新展開、「神経再生過程における遺伝子発現とその機能」1996年4月1-3日
- 2) 木山博資、桐生寿美子、澁川一彦、守田直規、第11回神経組織の成長・再生・移植研究会ミニシンポジウム、「Differential Display PCR法と分子組織化学的手法を用いた神経軸索再生関連遺伝子の検出法と得られた遺伝子群の意義」1996年6月1日、

- 3) Morita N, Kiryu S, Kiyama H, 第102回日本解剖学会総会、Cloning of a novel nerve regeneration related gene using differential display PCR method.1997年4月1-3日
- 4) Namikawa K, Khalil M, Okado H, Kiyama H, 第102回日本解剖学会総会、Gene delivery in to injured motoneurons using replication-detective adenoviral vectors、1997年4月1-3日
- 5) 水野誠、金銅英二、西村光弘、上田裕、木山博資、遠山正弥、第102回日本解剖学会総会、一次求心性知覚ニューロンにおけるサイトカイン受容体情報伝達分子STATファミリーの局在、1997年4月1日~3日。
- 6) 木山博資、千里ライフサイエンスセミナー・ブレインサイエンスシリーズ第10回、損傷神経の再生と機能修復、「損傷神経の生存・再生に関与する遺伝子群」、1997年9月26日、
- 7) 木山博資、北海道ペインクリニック学会、教育講演、「神経系におけるサイトカインとその痛覚・炎症情報伝達への関与」、1997年11月1日、
- 8) 木山博資、大阪大学タンパク質研究所セミナー、長寿科学への分子学的アプローチ、「損傷運動神経細胞の生と死の起点を探る、1997年11月28日、

研究成果

本研究の目的は標的遺伝子組換えを用いるのではなく標的遺伝子の発現を一時的に抑制しようと試みるものである。この系を開発するにあたって、我々が以前から神経再生関連遺伝子の探索を行っていた経緯も考慮し、本研究では損傷を与えた後神経再生時に特異的に発現する遺伝子群の発現を抑制することによって、それら遺伝子の機能を検討することを目指した。このために、神経損傷に応じて著しい発現促進を示す遺伝子 GAP-43 の発現をコントロールしているプロモーターに着目し、このプロモーターの下流に目的遺伝子のアンチセンスやリボザイムをコードした遺伝子のトランスジェニック動物を作成することを試みた。(リボザイムによる機能抑制に関しては、我々は GAP-43 リボザイムを用い *in vitro* の系で確認を行った。Imaizumi et al, Mol. Brain Res. 1995).平成7年度はGAP-43 プロモーター領域のクローニングを行い、平成8年度には、これが正しく作動することを試みるために本プロモーターの下流に LacZ を結合させた遺伝子のトランスジェニックマウスの作成を試みた。GAP-43 は成熟動物ではあまり発現しておらず、発生の過程や神経再生時に多く発現することが知られているので、胎児の時点で LacZ の発現パターンを確認し目的の遺伝子発現を行っているかどうかを検討した。ここで、一つの問題点が明らかになった。トランスジェニックの効率が極端に悪いということである。神経傷害時に特異的に発現させるためにプロモーター領域を大きくとりすぎたためと考えられたため、GAP-43 プロモーター領域を短くし軽量化を試みた。LacZ の発現を指標に、各種プロモーター長のコンストラクトを用いトランスジェニック動物の作成を試みた。平成9年度に入ってからようやく GAP-43 のプロモーターの下流に GAP-43 の N 末のアミノ酸配列と LacZ の融合蛋白をつないだコンストラクトによるトランスジェニック動物が完成した。N 末の GAP-43 のアミノ酸配列は成長円錐ターゲティングシグナルであり、これにより発現した LacZ は軸索へと運ばれる。本トランスジェニック動物は本研究の最終目標産物ではないが、今後の神経可塑性や再生の研究には極めて利用価値が高く、今までに技術的に困難であった再生や可塑性時のシナプスや軸索先端を特異的に検出できる点で今後の研究が多いに期待される。本トランスジェニック動物に関する報告は1997年にアメリカのニューオリンズで開催された第27回北米神経科学界で発表した(アブストラクトを添付)。本トランスジェニック動物を用いた研究に関しては現在展開中である。

上述のようなトランスジェニック動物の作成を試みる傍ら、当初の予定にはなかったものだが、発生工学的な遺伝子発現抑制の手法にとって変わる新たな手法で、さらに多くの利点を有すると考えられるアデノウイルスを用いた遺伝子導入の方法の開発を同時に開始した。アデノウイルスは非分裂性の神経細胞にきわめて効率良く感染することが分かっており、末梢神経の損傷部位から損傷神経細胞にのみ遺伝子を導入することが可能であると予想された。本手法により、当初我々が目指した方法をより簡便に行うことができるため、より汎用性に富んだ手法であると考えられた。先ず、LacZ を発現させるアデノウイルスベクターを作成し、LacZ 発現を指標にさまざまな導入法を試みた。その結果、損傷部位を加工することによって、きわめて効率の良い遺伝子導入が可能と