

氏名(本籍)	水野聖哉(埼玉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第6218号
学位授与年月日	平成24年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	挿入突然変異マウスにおける脳梁欠損原因遺伝子の究明

主査	筑波大学教授	理学博士	志賀隆
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	一條裕之
副査	筑波大学講師	博士(理学)	榭和子
副査	筑波大学助教	博士(薬学)	長谷川潤

論文の内容の要旨

(目的)

脳梁の形成に関与する遺伝子は多数報告されているが、その作用機序は解明されていない。Tet-on & off 遺伝子導入マウス (TAS マウス) を作製し、戻し交配により作製した BALB/c 系統の遺伝背景をもつ TAS マウス (C.TAS マウス) を解析したところ、脳梁欠損を示す個体が出現することを見出した。Tet-on & off 遺伝子は脳の発生に対し影響を及ぼさないと考えられているため、C.TAS マウスで観察される脳梁欠損は導入遺伝子の挿入により引き起こされたホストゲノムの変異に起因するものと予想される。そこで、本論文では TAS マウスにおける脳梁欠損の原因遺伝子を特定することを目的とした研究を行った。

(対象と方法)

(1) C.TAS マウスにおける midline glial populations と脳梁を形成する軸索について、各種抗体を用いた免疫染色によって観察した。(2) C.TAS マウスにおける導入遺伝子の染色体挿入部位を、fluorescence *in situ* hybridization (FISH)、RT-PCR および Genome walking 法により解析した。(3) C.TAS マウスで発現異常が認められた遺伝子の発現様式と細胞内局在を Northern blotting、Western blotting、免疫染色により検討した。(4) C.TAS マウスにおいて発現異常が認められた *Cables1* (CDK5 and Abl enzyme substrate1) 遺伝子のノックアウトマウス (*Cables1* KO マウス) を作製し、脳梁形成について形態学的手法を用いて解析した。(5) C.TAS マウスと *Cables1* KO マウスとの交配により得たマウスの脳梁を形態学的手法を用いて解析した。

(結果)

C.TAS マウスでは大脳の中まで脳梁軸索は投射されていた。また、midline glial populations は存在していたが、左右の半球の離断と中隔の形態異常が観察された。

次に、複製中期の染色体標本を用いた FISH 解析を行った。その結果、導入遺伝子は第 18 番染色体に挿入されていることが明らかとなった。次いで、間期核染色体標本を用いたマルチカラー FISH 解析により、導入遺伝子の挿入領域は第 18 番染色体の 11.1 Mb から 12.9 Mb の間であることが判明した。この領域を Long PCR により解析した結果、TAS マウスでは第 18 番染色体の 12,058,849 bp から 12,070,825 bp までの約 12 kb のゲノム配列が欠損しており、その欠損部に導入遺伝子が挿入されていることが明らかとなった。さ

らに Genome walking 解析により、*Cables1* 遺伝子の第 4 エクソンが欠損し、その部位に導入遺伝子が挿入されていることが確認された。この変異 *Cables1* 遺伝子を *Cables1^{TAS}* 遺伝子と名付けた。

C.TAS マウスにおける *Cables1* の発現を検討するために、ホモ C.TAS マウスと野生型マウス的大脑より RNA を抽出して Northern blotting を行った結果、ホモ C.TAS マウスでは *Cables1* 第 1～3 エクソンまでと *tTS* が融合した *Cables1^{TAS}* mRNA だけが発現しており、野生型 *Cables1* の発現は確認されなかった。この *Cables1^{TAS}* cDNA を発現ベクターに導入し、HEK293T 細胞に発現させて Western blotting 解析を行った結果、*Cables1* の第 1 から 3 エクソンに相当する分子量の約 30KDa のタンパク質が検出された。また、神経様細胞に分化誘導した Neuro2A 細胞を用いて *Cables1* の細胞内局在を解析したところ、*Cables1^{TAS}* は野生型 *Cables1* と同様に細胞体と神経突起に存在していた。

さらに *Cables1* の脳梁形成における役割を明らかにするために、BALB/c 由来の ES 細胞を用いて *Cables1* のノックアウト (KO) マウスを作製し、解析した結果、*Cables1* KO マウスは正常な脳梁形態を示した。従って、*Cables1* 遺伝子の欠失でなく *Cables1* 遺伝子が *Cables1^{TAS}* 遺伝子へと変異することが、C.TAS マウスにおける脳梁欠損の原因であることが示唆された。そこで、*Cables1* KO マウスとヘテロ C.TAS (*Cables1^{+TAS}*) マウスを交配し、得られた *Cables1* KO-TAS (*Cables1^{-TAS}*) マウスを観察したところ、6 例ともすべて脳梁が欠損していた。従って、野生型の *Cables1* 遺伝子が *Cables1^{TAS}* 遺伝子へと変異することが脳梁欠損の原因であることが示唆された。

(考察)

本研究において、脳梁欠損を示す C.TAS マウスにおける導入遺伝子の挿入突然変異部位を特定し、この挿入突然変異により *Cables1* 遺伝子が *Cables1^{TAS}* 遺伝子に変異したことを明らかにした。さらに、*Cables1* KO マウスは脳梁欠損を示さなかったのに対し、C.TAS マウスと *Cables1* KO-TAS マウスでは脳梁が欠損していたことから、C.TAS マウスが示す脳梁欠損は、変異タンパク質 *Cables1^{TAS}* の効果に起因すると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、BALB/c 系統の遺伝背景において脳梁欠損を示す C.TAS マウスにおける導入遺伝子の挿入突然変異部位を特定し、脳梁欠損の原因が *Cables1* 遺伝子の完全欠損ではなく、挿入突然変異による *Cables1* 遺伝子の *Cables1^{TAS}* 遺伝子への変異であることを示した。従って、本研究は、脳梁形成の新規の機構を示したことで高く評価できる。

平成 24 年 1 月 6 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。