

氏 名 もはめど いぶらひむ さいど いぶらひむ だるういしゅ
Mohamed Ibrahim Sayed Ibrahim Darwish

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富生命博甲第 129 号

学位授与年月日 令和 3 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院生命融合科学教育部 博士課程
認知・情動脳科学 専攻

学位論文題目
Improvement of mouse genome editing protocol and the application:
investigation of the physiological roles of glycine receptor alpha 4 subunit.
(マウスゲノム編集法のプロトコル改良とその応用：グリシン受容体 $\alpha 4$
サブユニットの生理的機能解析)

論文審査委員

(主査) 教授 森 寿

(副査) 教授 中島 彰俊

(副査) 教授 西条 寿夫

(副査) 教授 戸邊 一之


(指導教員) 教授 高雄 啓三

The glycine receptors (GlyRs) are ligand-gated chloride channels composed of alpha (α 1-4) and β subunits. GlyR subunits play major roles in mammals CNS ranges from regulating simple sensory information to the modulation of higher-order brain function and are involved in several neurological diseases. The GlyR α 4, unlike other GlyR subunits, received relatively little attention because the human ortholog is considered as a pseudogene due to a lack of transmembrane domain. Interestingly, GlyR α 4 has been recently reported as a risk gene for several neurological diseases in humans including startle disease and an autism spectrum disorder. However, the physiological roles of GlyR α 4 in mammal behavior and whether it is involved in neurological diseases are fully unknown.

In the dissertation, I first describe a developed protocol to generate the needed mice using the CRISPR/Cas9 system (Chapter 1). The protocol combines a modified method for cryopreserving 1-cell C57BL/6J embryos, which improved embryos' developmental rates, with optimized electroporation conditions. Using this protocol, I generated several lines of knockout mice and knock-in mice with high-efficient mutation rates (100%, 50%, respectively) and a low mosaic rate within 4 weeks. Secondly, I show the temporal and spatial expression profile of GlyR α 4 in the brain and the comprehensive behavioral analysis of *Glr4* mutant mice to elucidate its role in mouse behavior (Chapter 2). GlyR α 4 subunit is mainly enriched in the hindbrain and midbrain and its expression is gradually increased during brain development. The *Glr4* mutant mice showed a low percentage of entries into open arms of the elevated plus maze test compared to wild-type littermates and showed decreased amplitude and delayed onset of the startle response. Moreover, they exhibited increased sociality in the home cage during the active period.

Collectively, the work describes a modified method to expedite and enhance mouse transgenesis. Besides, the data shed light on the behavioral roles and spatiotemporal expression pattern of the GlyR α 4 subunit and suggest that glycinergic signaling modulates social and startle behavior in the mouse.

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富生命博甲第 号 富生命博乙第 号	氏 名	Mohamed Ibrahim Sayed Ibrahim Darwish
論文審査委員	職 名 (主査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 教 授	氏 名 森 寿 西条 寿夫 中島 彰俊 戸邊 一之	
指導 (紹介) 教員	教 授	高雄 啓三	
(論文題目 英文の場合は和訳を付記すること) Improvement of mouse genome editing protocol and the application: investigation of the physiological roles of glycine receptor alpha 4 subunit. マウスゲノム編集法のプロトコル改良とその応用: グリシン受容体 $\alpha 4$ サブユニットの生理的機能解析			(判定) <input checked="" type="checkbox"/> 合格
(論文審査の要旨)			
[研究目的] グリシン受容体 (GlyR) チャンネルは、 α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) と β サブユニットから構成されるリガンド依存性 Cl^- 透過型受容体であり、中枢神経系での抑制性神経伝達や感覚情報処理に関わる。GlyR チャンネルは、さらに高次脳機能の修飾や神経精神疾患にも関わっていると考えられている。GlyR $\alpha 4$ サブユニット遺伝子は X 染色体上に位置し、ヒトではナンセンス変異により膜貫通領域を欠損することから機能していない偽遺伝子と考えられてきた。一方で、GlyR $\alpha 4$ 遺伝子は、ヒトのびっくり病 (startle disease) や自閉症スペクトラム障害などの神経系疾患のリスク遺伝子の一つとして報告された。このように、GlyR $\alpha 4$ 遺伝子の行動への関与などの生理的機能や神経系疾患への関与は十分に明らかにされていない。そこで Mohamed Darwish 君は、ゲノム編集法を改良し、マウス GlyR $\alpha 4$ 遺伝子の変異マウス系統を作製し、その生理学的機能を、網羅的行動試験等を用いて明らかにすることを目的として研究を行った。			
[研究方法]			
1) ゲノム編集法の改良 CRISPR/Cas9 システムを用いたマウスでのゲノム編集は、受精卵の採取、胚操作、マイクロインジェクションなど煩雑で時間のかかる手法として確立されていた。また、得られるゲノム編集個体がモザイクになるなど効率の低さが問題となっていた。これらの点を改良するために、人工授精で受精卵を多数準備すること、凍結保存条件を検討し生存率の高い受精卵を準備すること、1 細胞期に電気穿孔法で一度に多数の受精卵を操作し、ゲノム編集の効率を上げる条件を設定した。			
2) GlyR 遺伝子の発現解析			

脳内でのGlyRサブユニット遺伝子の発現を、発達段階ごとに脳部位を切り分けた試料を用いRT-PCR法で検討した。

3) 網羅的行動解析による GlyR α 4変異マウスの解析

一般的身体所見、不安、驚愕反射、社会性、うつ様行動、記憶学習などを一連の行動バッテリーテストにより解析を行った。

[結果]

1) ゲノム編集法の改良

ゲノム編集法と胚操作法の改良を行い、特にマウス受精卵凍結時にウシ胎児血清 (FBS) を添加することで解凍後の胚生存率が向上し、多数の1細胞期胚を電気穿孔法で操作することでモザイク率も低く高効率なゲノム編集法を確立した。この方法で、GlyR α 4以外の複数の遺伝子変異マウス系統も高効率に作製した。

2) GlyR遺伝子の発現解析

RT-PCR法により、GlyR α 1-4、 β の遺伝子発現解析を行い、 α 2が出生後3週齢で減少すること、それ以外のサブユニットはいずれも週齢に伴って増加することを見出した。また、6週齢でGlyR α 4は、後脳、中脳などで検出されたが大脳皮質、海馬などでは検出されなかった。

3) 網羅的行動解析

GlyR α 4遺伝子を標的としたゲノム編集法により、エクソン4 に 11 bp の欠失変異を導入した変異マウスを作製した。ウェスタンブロット解析の結果、変異マウスでは GlyR α 4 は完全には欠失しておらず発現低下マウスと考えられた。変異マウスは、不安様行動の増加、驚愕反射の減少と遅延、社会性の向上などの行動学的表現型を示し、GlyR α 4がいくつかの生理機能に関わる分子であることが明らかとなった。

[総括]

本研究で、Mohamed Darwish 君はゲノム編集法と胚操作法を改良し、特に凍結受精卵の保存液にFBSを添加することで胚の生存率を向上させる方法を発見した。この方法は、発生時期が同じ多数の受精卵を扱うことを可能とし、1細胞期でのゲノム編集によりモザイク個体が生じにくく、ゲノム編集効率の向上に寄与すると考えられる。また、マウス GlyR サブユニットの時空間的遺伝子発現パターンを明らかにし、さらに、これまで報告のない新規のGlyR α 4遺伝子変異マウス系統を作製して網羅的行動解析により不安様行動、驚愕反射、社会性などの生理機能に、GlyR α 4サブユニットが関わることを初めて明らかとした点は、新規性が高く、医学における学術的重要性が認められる。GlyR α 4 サブユニットのヒト遺伝子は、偽遺伝子と考えられてきた一方で、びっくり病 (startle disease) や自閉症スペクトラム障害などの神経系疾患のリスク遺伝子の一つとして報告されているため、今後 GlyR α 4 遺伝子変異マウス系統を詳細に解析することで、ヒトでの神経精神疾患の病態解明や発達障害の新たな治療法の開発につながる臨床的発展性があると考えられる。

以上より本審査会は本論文を博士 (医学) の学位に十分値すると判断した。