



ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」

第7回ラットリソースリサーチ研究会

講演抄録集

平成26年1月31日（金） 13:00 – 17:30

京都大学 百周年時計台記念館



第7回 ラットリソースリサーチ研究会 プログラム

開会の辞

13:00-13:05

庫本 高志 (京都大学 大学院医学研究科附属動物実験施設)

第1部

座長：並河 徹 (島根大学 医学部病態病理学)

柳川 右千夫 (群馬大学 大学院医学系研究科遺伝発達行動学分野)

ラットリソース

1. ラットを用いた高次脳機能研究を目的とした動物実験施設
の概要と特質
高橋 英機 (理化学研究所脳科学総合研究センター 動物資源開発支援ユニット) 13:05-13:35
2. SHR 系ラットの全ゲノムシーケンス解析
磯村 実 (島根大学 医学部病態病理学) 13:35-14:05
3. BAC トランスジェニックラットを応用した脳機能研究
小林 和人 (福島県立医科大学 医学部生体機能研究部門) 14:05-14:35
4. CRISPR/Cas システム：ラット遺伝子改変技術のさらなる展開
吉見 一人 (京都大学 大学院医学研究科附属動物実験施設) 14:35-15:05

休憩 (coffee break)

15:05-15:30

第2部

座長：筆宝 義隆（国立がん研究センター 発がんシステム研究分野）

真下 知士（京都大学 大学院医学研究科附属動物実験施設）

ラットリサーチ

5. マウス・ラットの表現型から関連疾患を探すデータベース 15:30-16:00
榎屋 啓志（理化学研究所バイオリソースセンター マウス表現型知識化研究開発ユニット）
6. セイピン欠損(SKO)ラットを用いた先天性全身性脂肪萎縮症 16:00-16:30
原因遺伝子セイピンの生理的意義の解明
海老原 健（京都大学医学部附属病院 臨床研究総合センター）
7. イハラてんかんラットを用いた神経発生およびてんかんの研究 16:30-17:00
星野 幹雄（国立精神神経医療研究センター 神経研究所病態生化学研究部）
8. オプトジェネティクス(光遺伝学)による脳・神経系へのアプローチ 17:00-17:30
八尾 寛（東北大学 生命科学研究所脳機能解析分野）

懇親会

18:00-20:00

主催：ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」

〒606-8501

京都市左京区吉田近衛町

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

Tel: 075-753-9318 Fax: 075-753-4409

E-mail: nbrprat@anim.med.kyoto-u.ac.jp

抄 録

1. ラットを用いた高次脳機能研究を目的とした動物実験施設の概要と特質

高橋英機

独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター動物資源開発支援ユニット

高次脳機能研究では、行動解析やイメージング解析が重要である。脳科学総合研究センター(BSI)ではこれらの解析機能を重視した3階建ての独立した「神経回路遺伝学研究棟」(延べ床面積約9,500 m²)を建設し、2011年より稼働させている。動物実験施設は「神経回路遺伝学研究棟」の2、3階に位置する。この動物実験施設の特徴は、BSIにおけるラットの利用ケージ数が年々増えてきていることも考慮し、規模が大型(ラット約3,000ケージ、マウス約20,000ケージ)であること、飼育スペース(延べ床面積約3,000 m²)にほぼ匹敵する程の実験スペースを設けたこと、にある。また飼育室および実験室の双方において、米国の動物実験施設で主流となっているスイート様式を日本で初めて採用したことも大きな特徴である。

3階は飼育エリアであり、ラットとマウスの繁殖並びに系統維持を目的とする。ラット用には2スイートあり、1スイートは約160 m²で、4または5飼育室と1処置室で構成され、約1,300ケージを収納できる。マウス用には4スイートあり、1スイートは約230 m²で、5飼育室と1処置室で構成され、約4,500ケージが収納できる。この他に、器材倉庫室、検疫室、胚操作室、培養室、飼育スタッフの居室がある。

2階は実験エリアである。P2A対応の行動解析スイート、In-vivoイメージング解析スイートがあり、スイート区域外に電気生理実験室がある。行動解析スイートは1スイートが約230 m²で、6実験室と1飼育室および1処置室で構成される。このようなスイートが4つある。各スイートの飼育室ではラットであれば300ケージ、マウスであれば420ケージを長期で飼育可能である。スイート内で飼育室から実験室または処置室への動物の移動を自由に行う事ができるため、研究者にとってより実験が行いやすい環境となっている。In-vivoイメージング解析スイートは125 m²の1スイートで、3実験室と1処置室から構成される。処置室にはラットおよびマウスが飼育できる飼育ラックを整備した。電気生理実験室は約130 m²の部屋を2室設けた。電気生理実験室の内1室にはIn-vivoイメージング解析スイートの処置室からのパスボックスを併設し、サンプルの受け渡しが容易にできるようにした。この他に器材倉庫室、洗浄室がある。

本発表では、解析機能を主体とした先端的研究の成果が大きく期待される当実験施設を紹介する。

MEMO

2. SHR系ラットの全ゲノムシーケンス解析

磯村 実

島根大学医学部病態病理学

SHR(Spontaneously Hypertensive Rat)は岡本らによりWKY(Winster-Kyoto)系ラットより高血圧を指標として系統分離された。SHR系ラットには高血圧に加え100%脳卒中を発症するSHR-SP(Stroke-prone SHR)と、脳卒中は発症しないSHRが存在する。これらの系統は、高血圧や脳卒中の発症機序の解明に大きく寄与している。今回、SHR系ラット2系統(SHR/Izm, SHR-SP/Izm)、並びにコントロールとして用いられるWKY系ラット(WKY/Izm)の全ゲノムシーケンスデータを得たので、系統間の比較を行った。肝臓より抽出された各系統のゲノムDNAについて、SOLiD 4システムを用いフラグメント解析とペアードエンド解析が行われ、それぞれ50塩基と85塩基の配列が得られている。それぞれの系統について、これらの短い塩基配列が500万リード得られており、これはラットゲノムを約20回カバーしている量に相当する。次にNCBIにて公開されているBN系統ラットのゲノム配列バージョン4(rn4)をリファレンスとして、シーケンサーより得られた配列のマッピングを行い、各系統の全ゲノム配列を完成させた。次に各系統のゲノムとリファレンスであるBNラットのゲノムとの比較で一塩基多型(SNP)を示す部位をゲノム全体にわたり同定した。その結果、SHR系ラットで認められたSNPのうちWKYにも共通してみられたものは約66%であり、残りはSHR系ラットのみで認められた。SHRとSHR-SPの間では82%のSNPが共通に認められる。一方、SHRとSHR-SPの間では、WKYと共通に見られるSNPの分布が異なっているゲノム領域が存在していた。これらのゲノム領域はSHRとSHR-SPとの形質の違いに関連しているものと考えられた。

MEMO

3. BAC トランスジェニックラットを応用した脳機能研究

小林 和人

福島県立医科大学医学部生体機能研究部門

トランスジェニックラットは、高次脳機能の研究を総合的に発展させるために重要な研究リソースを提供する。ラットを脳研究に使用する利点として、(1) 神経回路機能を解析する際に、脳の部分破壊や薬物やウイルスの局所注入が容易に行える、(2) 行動課題遂行中の電気生理実験の研究が進んでいる、(3) 学習の解析等、多くの行動課題が確立されているなどの点が挙げられる。現在、遺伝子操作により脳神経回路を構成する特定のニューロンタイプの機能を改変するさまざまなアプローチが発展してきた。これらの技術を応用することにより特定神経の除去、伝達抑制、光遺伝学や化学遺伝学による活動の制御などが可能となり、脳機能の基盤となる神経回路の仕組みの研究が進んできた。このような技術を BAC トランスジェニックラットに応用することにより、これまで他の動物モデルでは研究に限界のあった、さまざまな高次脳機能の研究に利用することにより脳科学研究を大きく発展させる可能性が示唆される。

動物の行動は、学習や経験に依存して環境に適合するために変化する。道具的学習は、行動の結果得られる強化因子（報酬など）が動物の行動に影響を与える学習の様式であり、反応が強化因子を得るための手段（すなわち道具）になっているという意味から、このように表現される。道具的学習は、意思決定、行動選択などの多くの随意的な行動の基盤であると考えられている。道具的学習の獲得と実行にはさまざまな脳領域が関与する。このような学習に関与する脳領域は明らかになってきたものの、神経回路を構成するニューロンタイプや神経連絡の機能的な役割など、学習の基盤となる神経機構については十分に理解されていない。道具的学習の機構の解明において、特定の遺伝子や細胞タイプの機能を改変した動物モデルは有益な実験系を提供する。

本研究会では、神経回路から特定のニューロンタイプを除去するアプローチと shRNA 導入によるノックダウンの技術を用いて、道具的学習に重要な役割を持つ線条体という脳領域を構成するニューロンタイプの役割を解析した例について述べる。第一に、線条体から淡蒼球に投射する間接路ニューロンが、刺激に基づいて行動を選択する弁別学習の実行において反応特異性の決定に必須の役割を持つことを明らかにした。また、線条体に局在するアセチルコリン作動性介在ニューロンは、行動を柔軟に切り替えるスイッチの過程を抑制し、この抑制にはムスカリン性 M₄ 受容体サブタイプが重要な役割を持つことを明らかにした。今後の BAC トランスジェニックラットを利用した脳科学展開のためのアプローチについて紹介する。

MEMO

4. CRISPR/Cas システム：ラット遺伝子改変技術のさらなる展開

吉見一人

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

近年、ZFN、TALEN といった人工ヌクレアーゼによるゲノム編集技術の登場により、遺伝子改変ラットを自由に作製できるようになった。ヒト疾患モデルや遺伝子解析モデルとしてのラットの利用価値はますます高まってきている。最近、新たなゲノム編集技術として、細菌の免疫機構を利用した CRISPR/Cas システムが開発された。ガイド RNA (gRNA) がゲノム上の標的配列を認識・結合し、そこへ誘導された Cas9 ヌクレアーゼが二本鎖 DNA を切断することで、標的遺伝子に変異を導入する。gRNA は、ZFN、TALEN に比べて、短期間で低コストかつ簡単に作製できる。また、複数の gRNA を同時に用いることで、複数の遺伝子を改変することも可能である。本研究では、CRISPR/Cas システムをラットに適用し、ノックアウト、ノックインラットを作製することで、簡単、迅速、正確で自由度の高い遺伝子改変ラット作製技術を確立することとした。

毛色遺伝子チロシナーゼ (*Tyr*) の配列を認識する gRNA を作製し、受精卵へ Cas9 mRNA および gRNA を導入することで、*Tyr* ノックアウトラットを作製することに成功した。興味深いことに、野生型 *Tyr* を持つ DA 系統と、*Tyr* に点変異を持つ F344 系統との F1 個体を用いた場合、*Tyr* の片側アレルだけをノックアウトすることができた。すなわち、CRISPR/Cas は 1 塩基の違いを正確に認識し、アレル特異的に遺伝子を改変できることがわかった。

F344 系統は、*Tyr* の点変異によりアルビノを示すが、*Asip* 遺伝子の 19 塩基欠損変異 (ノンアゲーチ色)、*Kit* 遺伝子のレトロトランスポゾン挿入変異 (頭巾斑) を有することが知られている。そこで、Cas9 mRNA、gRNA とともに、野生型配列を持つ一本鎖オリゴ DNA を受精卵に導入することで、*Tyr*、*Asip*、*Kit* 各遺伝子について、1 塩基置換、19 塩基挿入、レトロトランスポゾン除去したノックインラットの作製に成功した。これら全てのノックインラットで表現型が修復されることも確認した。

以上から、CRISPR/Cas システムを用いることで、今まで以上に簡便、迅速かつ正確にノックアウト、ノックインラットの作製が可能であることが明らかとなった。特にノックインラット作製技術は、ヒトで同定された変異や SNP をラットゲノムに正確に反映させた遺伝子改変ラットの作製や、特定の遺伝子をヒトホモログに入れ替えたヒト化ラットの作製を可能にする。こうした優れたモデルラットの創出は、遺伝子の新規生理機能の解明や医薬品の開発研究に大きく貢献するだろう。

MEMO

5. マウス・ラットの表現型から関連疾患を探すデータベース

榎屋啓志

理化学研究所バイオリソースセンターマウス表現型知識化研究開発ユニット

マウスおよびラットは、実験解析が可能な疾患モデル動物として極めて重要なバイオリソースである。今後、ゲノム情報や大規模解析技術の向上によって、これらのリソースの機能解析は爆発的に進展していくと考えられ、疾患や創薬研究に対して大きく貢献することが期待されているが、ニーズに十分に応えるためには、情報面の整備、つまり、多種多様な情報を整理統合し、互いの関連性が明らかになるようなかたちで研究コミュニティへ供給することが必須である。

しかしながら、表現型解析は極めて多種、多様であり、その測定項目は無限と言っても良い。これらの情報を整理統合するには、測定対象となる部位や、生命現象、種間の違い、さらには、各実験によるコントロール値の違い、実験結果を解釈する考え方の違いなどを、コンピュータ内に蓄えられた『知識』に基づいて、自動的に処理する必要がある。

我々は、コンピュータのための知識データであるオントロジーを用いて、マウス・ラットにおける個体レベルの特性情報を、種の違いを明示しながら、自動推論を行うシステムの開発、検証を試みている。マウス、ラットの分野で、重要な役割を果たすプロジェクトである、京都大学：NBRP ラットデータベース、遺伝研：マウス表現型データベース、および東京大学：臨床医学オントロジーのデータ供与を受け、これらの表現型データを結合し、ヒト疾患情報データとの関連づけを行うシステムの開発について紹介する。

MEMO

6. セイピン欠損 (SKO) ラットを用いた先天性全身性脂肪萎縮症原因遺伝子セイピンの生理的意義の解明

海老原 健¹、阿部 恵¹、細田公則¹、中尾一和²

1. 京都大学医学部附属病院 臨床研究総合センター
2. 京都大学大学院医学研究科 メディカルイノベーションセンター

先天性全身性脂肪萎縮症 (BSCL: Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy) は生下時より全身の脂肪組織の欠如を認める常染色体劣性の遺伝性疾患である。近年、BSCL の原因遺伝子が相次いで同定されている。中でもセイピン遺伝子異常症 (BSCL2) は BSCL の中で最も重症であり、残存脂肪組織は殆ど認められず、脂肪萎縮に伴うインスリン抵抗性糖尿病をはじめとする代謝合併症も重度である。また BSCL2 では脂肪萎縮症以外に高頻度に軽度の精神発達遅滞を呈することも知られている。一方、セイピンは 398 アミノ酸から成る蛋白質であるが、既知蛋白質と相同性が認められず、その機能は不明である。

我々はセイピンの機能および生理的意義の解明を目的にセイピン遺伝子変異動物を作製し解析することとした。動物種の選定にあたり、ラットおよびマウスでの各臓器におけるセイピン遺伝子発現を検討した。ヒトにおいては脂肪組織以外にも脳と精巣でセイピン遺伝子の高発現が認められる。一方、ラットではヒトと同様に脳と精巣で高発現が認められるのに対し、マウスでは脳での発現亢進が認められなかった。そこでセイピン遺伝子の発現パターンがヒトと類似するラットを用いてセイピン遺伝子異常症のモデル動物作製を試みることにした。京都大学医学部動物実験施設で開発された新規 DNA スクリーニング法 (MuT-POWER) と凍結精子アーカイブからの個体復元技術 (ICSI) を利用した ENU ミュータジェネシスによる標的遺伝子変異ラット作製システムにより 20 番目のアミノ酸がストップコドンに置換される事実上のセイピンノックアウト (SKO) ラットを得ることができた。SKO ラットはヒトのセイピン遺伝子異常症と同様に全身の脂肪組織が欠如し、脂肪萎縮症に特徴的なインスリン抵抗性糖尿病や高中性脂肪血症、脂肪肝なども認められた。また、空間作業記憶の低下や精子形成不全も認められた。

この間、海外よりセイピンノックアウトマウスが複数報告されているが、いずれも、全身の脂肪組織の欠如は認めるものの中性脂肪は低値を示していた。また、脳神経系や精巣に関する表現型も報告されていない。セイピンの生理作用には種差が存在するものと考えられる。疾患モデル動物の作製にあたっては種の選択に注意が必要である。

MEMO

7. イハラてんかんラットを用いた神経発生およびてんかんの研究

星野幹雄

国立精神神経医療研究センター神経研究所病態生化学研究部

イハラてんかんラット(IER)は、生後3ヶ月からてんかん症状を呈し約一年で死に至る原因不明の自然発症ラット突然変異体である。生後から社会行動異常や記憶障害などを伴うために、「精神発達遅滞を伴うヒトてんかん」の良いモデルであると考えられて来たが、その発症機構や原因遺伝子は全く解明されていなかった。我々は、IERにおいててんかんが発症するメカニズムとその原因遺伝子を探索し、さらにその遺伝子の機能を明らかにすることによって、ヒト疾患の病態の理解に迫ろうと試みた。

IERのてんかん発作時の脳波では、発作直前に最初の興奮が認められるのが扁桃体であることが最も多いことがわかった。発症前でも、てんかん誘発刺激剤(PTZ)に対する感受性が極めて高いこと、扁桃体刺激によるキンドリング形成が容易に完成されることがわかり、IPSC記録から扁桃体の抑制神経細胞系の機能低下が示唆された。さらには、解剖学的解析では、扁桃体における抑制性ソマトスタチン陽性細胞の分布に異常があり、またその神経突起の形態にも異常があることが見いだされたため、これが扁桃体の神経回路抑制機能の低下をもたらし、てんかん発症の基盤となっているであろうことが示唆された。

また連鎖解析を行い、IERの原因遺伝子として膜貫通蛋白質をコードする*Dscaml1*を同定した。この遺伝子は、神経系に広く発現するが、IERではその発現が極端に低下している。また、IERではゲノムDNAがわずかに一塩基だけ置換されていて、その結果として*Dscaml1*のスプライシング異常を引き起こし、正常な蛋白質が生み出されないことがわかった。IERの表現型からは、DSCAML1蛋白質の機能として、神経突起の伸長・分岐や神経細胞の分布への関与が示唆されたが、それも*in vitro*実験系で検証された。また、この遺伝子の異常によって引き起こされるヒトてんかんを見つけるために、精神発達遅滞とてんかんの症例をリサーチリソースからスクリーニングしているところである。

本研究のようにイハラてんかんラットをモデル動物として用いた研究が、ヒトの精神発達遅滞やてんかんの発症・病態進展機構の理解につながるのではないかと期待している。

MEMO

8. オプトジェネティクス（光遺伝学）による脳・神経系へのアプローチ

八尾 寛

東北大学生命科学研究科脳機能解析分野

単細胞緑藻類クラミドモナスの一種 *Chlamydomonas reinhardtii* に由来するチャネルロドプシン 2 (ChR2) は、微生物型ロドプシンファミリータンパク質の一員であり、460–480 nm の青色光に応答して陽イオンを透過させ、膜電位を制御することにより、光依存的な行動を制御していると考えられている。Karl Deisseroth のグループおよびわれわれのグループは、それぞれ独立に、ChR2 の遺伝子をニューロンに導入する実験を行い、光パルスとニューロン活動を同期させることに成功した。特定の神経細胞に光感受性を組み込み、光刺激によるネットワーク活動の制御を可能にするオプトジェネティクス（光遺伝学）により、脳・神経系の機能が低い時空間分解能により解析される。この技術を推進する目的で、ChR2 遺伝子を *thy1.2* プロモーター制御下に発現するトランスジェニックラットを開発した。このラットの一系統においては、中枢神経系のさまざまなニューロンにおいて、ChR2 が発現し、光刺激に応答し活動が惹起できた。たとえば、海馬においては、歯状回顆粒細胞、CA3 錐体細胞、CA1 錐体細胞などの主要な細胞を光刺激できた。また、網膜においては、神経節細胞特異的な発現が認められた。したがって、脳機能の生理・病態生理研究、視覚再建研究などへの応用が期待される。

脊髄後根神経節 (DRG) や三叉神経節 (TG) は、皮膚、筋肉、関節などの体性感覚受容に関わるニューロンの集合である。本ラットにおいて、触覚などの機械受容や深部感覚を掌る大型の DRG/TG ニューロンに ChR2 が発現していることを確認した。しかし、痛覚、温度感覚などの侵害受容に関与する小型の後根神経節細胞には発現していなかった。また、メルケル小体やマイスナー小体などの皮膚の触覚受容器を構成している機械受容ニューロンの末梢神経終末にも ChR2 が分布していた。このラットの足裏に青色 LED の光を照射したところ、光に反応した足の動きが認められた。このラットの皮膚では、光が機械感覚受容器の神経終末で受け取られ、活動電位を発生し、脊髄、脳へと伝えられ、触覚などの知覚を引き起こしたことが示唆される。しかし、痛覚などの侵害感覚は引き起こされていない。本研究は、世界で初めて、皮膚で光を感知するラットの作製に成功したものである。

ラット口吻部に規則正しく配置されている頬ひげ (ウイスカ) の接触は、毛根において感知され、三叉神経→脳幹→視床を経て、反対側の大脳皮質一次感覚野へトポグラフィカルに情報が受け渡される。一次感覚野においては、ウイスカの 2 次元的な配列に対応した 2 次元的なバレル構造が形成されている (バレル野)。ウイスカの毛根に分布する機械受容神経叢にも ChR2 が発現していた。さまざまな時空間パターンの光をウイスカ配列に照射することにより、ウイスカへの様々な触覚入力が大脳皮質でどのような時空間的活動パターンを経て処理されているのかが明らかになると期待される。

MEMO