

NBRP Rat & Mouse News



GADアイソフォーム解析ツール

Vol.1 2022年9月

γ -アミノ酪酸(GABA)は、哺乳類の中樞神経系における主要な抑制性神経伝達物質です。GABAはグルタミン酸からグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)によって合成されます。GADにはGAD67とGAD65という分子量の異なる2種類のアイソフォームが存在し、それぞれGad1、Gad2遺伝子によって独立してコードされています。GAD65とGAD67はアミノ酸配列の同一性が65%と高い相同性を有していますが、分子量、補酵素の相互作用、細胞内分布により区別されています。GAD65とGAD67はGABA作動性ニューロンで共発現し、GAD65は活動依存的にGABAを合成して小胞放出するのに対し、GAD67は基底状態のGABA量を維持します。この2つのGADアイソフォームは、多くのヒト神経精神疾患と関連していることが報告されていることから、その機能解析に期待が集まっています。

Rat resources

ラットでは、CRISPR/Cas9或いはTALENのゲノム編集技術を用い、Gad1、Gad2遺伝子をそれぞれKOした系統が樹立されています。それぞれのヘテロKOラット(ダブルヘテロ)を掛け合わせて作製したGad1/Gad2ダブルKOラットは、マウス同様に脳内のGABAがほとんど存在せず、出生日にすべて死亡します。一方、Gad1、Gad2遺伝子単独のKOは、マウスの表現型と相違がみられます(表1)。Gad1 KOマウスの脳内GABA含量は野生型の7%にまで減少しますが、Gad1 KOラットでは野生型の18%が合成されており、GABA合成における両アイソフォームの寄与度が異なる可能性が示唆されます(Gad2 KOマウス、ラットの脳内GABA含量はそれぞれ87%、71%)。また、Gad1 KOラットは成体まで生存が可能であり、表現型の解析を行うことができます。ラットはマウスに比べ体が10倍程大きく、複雑な行動解析にも対応できる利点があります。Gad1 KOラット、Gad2 KOラットは、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」に寄託されており、入手することが可能です。

Depositor 柳川 右千夫 先生 (群馬大学)

Strain name

- LE-Gad1<em15Yyan> (Gad1 KO rats) ([NBRP Rat No. 0906](#))
- LE-Gad2<em24Yyan> (Gad2 KO rats) ([NBRP Rat No. 0907](#))

References

- CRISPR/Cas9-engineered Gad1 elimination in rats leads to complex behavioral changes: implications for schizophrenia. Fujihara K, Yamada K, Ichitani Y, Kakizaki T, Jiang W, Miyata S, Suto T, Kato D, Saito S, Watanabe M, Kajita Y, Ohshiro T, Mushiake H, Miyasaka Y, Mashimo T, Yasuda H, Yanagawa Y. [Transl Psychiatry. 2020 Dec 8;10\(1\):426.](#)
- Rats deficient in the GAD65 isoform exhibit epilepsy and premature lethality. Kakizaki T, Ohshiro T, Itakura M, Konno K, Watanabe M, Mushiake H, Yanagawa Y. [FASEB J. 2021 Feb;35\(2\):e21224.](#)
- Impact of GAD65 and/or GAD67 deficiency on perinatal development in rats. Jiang W, Kakizaki T, Fujihara K, Miyata S, Zhang Y, Suto T, Kato D, Saito S, Shibasaki K, Ishizaki Y, Isoda K, Yokoo H, Obinata H, Hirano T, Miyasaka Y, Mashimo T, Yanagawa Y. [FASEB J. 2022 Feb;36\(2\):e22123.](#)

表1. GAD65とGAD67の特徴

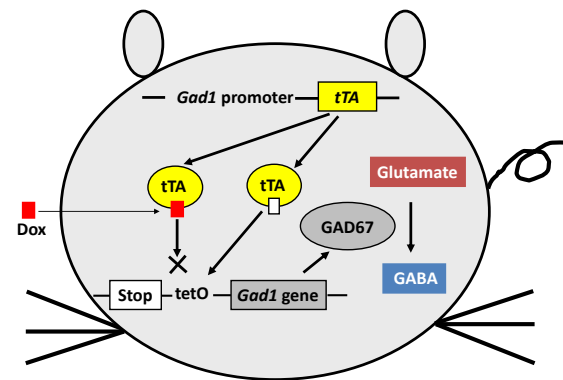
	GAD65	GAD67
遺伝子	Gad2	Gad1
分子量	65,000 Da	67,000 Da
構成されるアミノ酸数	585 個	593 個
ノックアウトマウス (ホモ接合体) の表現型	痙攣発作、痛覚感受性亢進 4週齢までは死亡なし 6月齢で約25%が死亡	口蓋裂、臍帯ヘルニア 出生日に100%が死亡
ノックアウトラット (ホモ接合体) の表現型	痙攣発作 4週齢まで約80%が死亡	幼若期の体重減少 記憶学習行動の障害 66%は離乳前に死亡 33%はアダルトまで生存

(注)分子量、アミノ酸数はマウスとラットに共通

Courtesy of Yuchio Yanagawa, M.D., Ph.D.

Mouse resources

Gad1 KOマウスは新生児致死であることが知られており、成熟脳におけるGAD67の機能不全がもたらす神経生物学的影響に関しては十分な理解が進んでいません。そこで、GAD67の成体でのグローバルロスの影響を解析するツールとして、理研BRCからは、テトラサイクリン制御遺伝子発現抑制システム(Tet-offシステム)を利用したGAD67ノックダウンマウスを提供可能です(図1)。このGAD67ノックダウンマウスはGad1翻訳開始点上流にStop配列に続いてtetO配列を挿入したマウス(Gad1-Stop-tetOノックインマウス; RBRC11364)と、内在性Gad1プロモーター制御下でtTAを発現するKI系統(Gad1-tTAノックインマウス; RBRC11365)との交配により作出します。産出したダブルノックインマウスは、成体まで生存し、ドキシサイクリン投与によってGAD67タンパク質の発現を抑制することができます。実際に、このGAD67ノックダウンマウスは行動異常を示すことが報告されており、今後、更なる解析により、神経精神疾患関連研究に貢献することが期待されます。



Courtesy of Yuchio Yanagawa, M.D., Ph.D.

図1. Tet-offシステムを用いたGAD67ノックダウンマウス
ドキシサイクリン (Dox) 未投与では、tTAタンパク質がtetO配列に結合し、Gad1遺伝子発現促進とそれに伴うGAD67タンパク質の産生が促進する。一方、Doxを投与すると、Gad1遺伝子発現抑制とそれに伴うGAD67タンパク質の産生が抑制される。

Depositor 柳川 右千夫 先生 (群馬大学)

Strain name
 ・ B6-Gad1<tm1(tetO)Ksak> (Gad1-Stop-tetO KIマウス) [RBRC11364](#)
 ・ B6;Cg-Gad1<tm1.1(tTA2)Kftnk> (Gad1-tTA KIマウス) [RBRC11365](#)

References
 ・ Global knockdown of glutamate decarboxylase 67 elicits emotional abnormality in mice. Miyata S, Kakizaki T, Fujihara K, Obinata H, Hirano T, Nakai J, Tanaka M, Itohara S, Watanabe M, Tanaka KF, Abe M, Sakimura K, Yanagawa Y. [Mol Brain. 2021 Jan 7;14\(1\):5.](#)
 ・ Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, Yamanaka A. [Cell Rep. 2012 Aug 30;2\(2\):397-406.](#)