

ジーンドリブン・ミュタジェネシス法を用いたカルシニューリン関連遺伝子の機能解析

●宮川 剛^{1),2)} ◆高雄 啓三^{1),2)} ◆遠山 桂子²⁾ ◆榎藤 洋一³⁾ ◆若菜 茂晴³⁾

1) 京都大学医学研究科先端技術センター 2) 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 3) 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター

<研究の目的と進め方>

研究代表者は、各種の遺伝子改変マウスに対して幅広い領域をカバーした行動テストバッテリーを行うことにより、各種遺伝子の新規機能を見出してきた。これまでに、この戦略によりカルシニューリン (CN) の前脳特異的欠損マウスが顕著な作業記憶の障害、注意の障害、社会的行動の障害などを含む統合失調症様の行動異常を示すこと (Zeng et al., 2001; Miyakawa et al., 2003) と、統合失調症患者の DNA サンプルを用いた相関解析により CN の遺伝子が統合失調症と強く相関していることを報告してきた (Gerber et al., 2003)。CN はドーパミン受容体や NMDA 受容体の下流に位置しており、統合失調症の CN 仮説は、ドーパミン仮説や NMDA 受容体仮説・神経発達障害仮説などと高い整合性をもつ。一方、CN を介した信号伝達経路・機能はすでに極めて詳細に知られているが、そのうちのどの信号伝達経路・機能が統合失調症の発症要因として重要な役割を果たしているのかは不明である。

本研究の目的は、CN 関連の信号伝達経路に関与する分子をコードする遺伝子のミュタントマウスについて行動解析を行うことにより、これらのうちのどの経路が統合失調症の多様な症状のうちのどれに重要な役割を果たしているかを明らかにすることである。研究の進め方としては、理研 GSC が大規模ミュタジェネシスプロジェクトで作出した化学変異原 ENU 突然変異マウスについて、CN 関連遺伝子の点変異スクリーニングを行う。単一塩基置換の変異を持つマウスを入手できれば、通常の遺伝子ノックアウトの null マウスとは違った遺伝子機能解析が可能となる。我々が行う網羅的行動解析は、作業記憶テスト、注意に関するテスト、ホームケージ社会的行動テスト等、統合失調症様の行動異常を検出できるテストを多数含んでおり、効果的なスクリーニングが可能である。これらのテストから見出される行動レベルでの表現型と変異の見出された遺伝子の既知の機能から、その脳内での機能発現についての推測を行う。

ターゲットの候補遺伝子として、CN を介した信号伝達経路上にある分子のうちシナプス小胞のエンドサイトーシスに関与する Dynamin、アクチン細胞骨格においてアクチンの脱重合に関与する Cofilin など 5 つの遺伝子を選定し、これらについて、ターゲットとする領域に約 60 のプライマーセットを設計して、スクリーニングのための multiplex PCR の条件検討を進める。研究分担者である若菜・榎藤 (理研 GSC チームリーダー) らは、理研プロジェクトとして構築・整備した総数 3 千万点突然変異からなる「変異マウスライブラリー」とその高速変異発見システムを用いて点変異検索を行い、候補の変異マウスを提供する。

<2007 年度の研究の当初計画>

1 万匹の突然変異マウスライブラリーのスクリーニングを継続して実施する。これにより目的とする変異をもつようなマウスの候補が決まり次第、凍結受精卵を融解してマウス個体を得る。マウスを京都大学の動物実験施設に搬入して行動実験可能な数に交配・繁殖するのに、半年から 1 年を要する。これらと平行して、

行動実験・解析の対象として ENU 変異マウスだけでなく、CN 関連遺伝子のノックアウトマウスや、精神疾患様の顕著な行動異常を示すような各種の変異マウスについても、別途、入手を進めて行動解析をする。

<2007 年度の成果>

1. CN 関連遺伝子の ENU 変異マウスのスクリーニング

Dynamin, CamKII beta など 5 つの候補遺伝子について、理研 GSC の協力により「ENU 変異マウスライブラリー」のスクリーニングを進め、2007 年度には 13 領域から 11 変異が見出された。この中にはアミノ酸置換変異が 1 つ見出されており、その変異は当該タンパク質のリン酸化特性に関わると考えられる。この変異がタンパク質の特性に与える影響を解析し、機能的な変異であればこのマウスを用いて行動解析を行う予定である。

2. 遺伝子改変マウスの行動解析

CN 関連遺伝子の遺伝子改変マウス 6 系統について網羅的行動解析の結果、個々の行動テストでは CN マウスと同方向の表現型 (=統合失調症様の表現型) が多数見出された。一方で、逆方向の表現型を示したものもあり、単純な結果にはならなかった。これまでに共同研究を含めて 70 系統以上の遺伝子改変マウスについて網羅的行動解析を実施しているが、ほとんどの系統でなんらかの行動表現型が見出されるという結果を得ている。この手法をさらに進めていくことにより、遺伝子と行動表現型をつなぐ重要な情報を蓄積できると考えられる。

3. 顕著な行動異常を示す ENU 変異マウスの行動解析

若菜・榎藤らによる一次スクリーニングで得られた ENU 変異マウスについて網羅的行動解析を行った。この変異マウスは活動性の亢進、不安様行動の低下などの精神疾患様の行動異常を示した。その他にもスタートレスポンスの低下を示しており、今後、これらの行動異常の神経メカニズムの解析をする予定である。

また、理研の ENU 変異マウスライブラリーには、2007 年 5 月に雑誌 Neuron に報告された Disc1 遺伝子に点変異をもつ 2 種のミュタントマウスが開発されている。この 2 系統は統合失調症だけでなくうつ病のモデルマウスになると報告されている。これらのマウスがこれまでに我々が同定した統合失調症のモデルマウスの系統とどの程度共通する表現型を示すのか網羅的行動解析により調べ、精神疾患モデルマウスに共通する分子メカニズムを検討する予定である (入手承諾済み)。

4. 班員間の共同研究や、連携して進めている研究

東京大医科研の中井謙太先生との共同研究を斡旋していただき、バイオインフォマティクスの研究を促進することができた。また、群馬大の畑田出穂先生とはマウスの行動解析と MIAMI 法によるゲノム解析という、双方向の共同研究による協力ができた。

<国内外での成果の位置づけ>

ゲノムシーケンズが同定されて以来、様々な遺伝子の機能を個体レベルで調べることの重要性が増してきている。米国や欧州では全ての遺伝子のノックアウトマウスを作るというプロジェク

トが推進されており、ENU 変異による 1 万匹の突然変異マウスライブラリーのスクリーニングもそれらと並ぶプロジェクトである。米国や欧州でのプロジェクトでは得られた変異マウスの行動解析が系統的にはなされておらず、それぞれの系統のマウスを比較することは困難であるが、研究代表者らの施設はこれまでに網羅的かつハイスループットな行動テストバッテリーにより表現型をスクリーニングできる国内最大規模の拠点として、国内外 60 以上の研究室と共同研究を進め、現在までに、84 系統、約 4000 匹のマウスについて行動解析を行っている。このため、得られた変異マウスの行動異常がどの程度の異常であるのかを容易に比較することが出来る。このような施設は世界でも他になく、大変ユニークであり、ENU 変異マウスの行動を網羅的に解析することにより、1 つのアミノ酸や塩基がどのような行動特性に影響を与えるかを効率よく解析することが出来る。今回解析した変異マウスの行動異常はきわめて顕著であり、この変異マウスの脳表現型の解析を進めることで、精神・神経疾患研究の進展に貢献することが出来ると考えられる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ENU 変異マウスのスクリーニングについてはアミノ酸置換を効率よく見出す PCR プライマーを設計するには、PCR 産物ができるだけ長く (600 bp に近い)、かつ、その中に含まれるコーディング配列が長いものほど良い。しかしながら選定した遺伝子自体の DNA 配列の特性もあって、選定した領域の大半の PCR 産物は、全長に占めるコーディング配列部分が短く、また、multiplex がうまく組めないプライマーセットであった。スクリーニングの結果、見出された変異はイントロンがほとんどという結果であったので、適当な長さのコーディングエキソンをもつかどうかは、候補の遺伝子を選定するさいの判断のポイントで効率よく変異を見出すのに重要と思われる。

<今後の課題>

ENU 変異マウスのスクリーニングについては、これまでの結果で、コーディングエキソンが短い遺伝子ではスクリーニングが効率よく進まないことが明らかとなっているので、今後は、200 bp 以下の短い PCR 産物でより鋭敏に変異検出できるような High Resolution Melt (HRM) 法を取り入れた高速スクリーンシステムの開発により、標的とする遺伝子上にアミノ酸置換やナンセンス変異などの点突然変異をもつマウスのスクリーニングシステムの構築が急がれる。

<成果公表リスト>

- 0606191436
Powell CM, Miyakawa T: "Schizophrenia- relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder?" , *Biological Psychiatry*, 59(12), 1198-207, (2006)
- 0606191502
Takao K, Miyakawa T: "Investigating genes- to-behaviors pathways in psychiatric disorders: An approach using a comprehensive behavioral test battery on genetically engineered mice" , *Annals of the New York Academy of Science*, 1086: 144-159, (2006)
- 0608101120
Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chanq CP, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, Yamasaki N, Miyakawa T, Francke U, Graef IA and Crabtree GR: NFAT dysregulation by increased dosag of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21., *Nature*, 441(7093), 595-600, (2006)

- 0701191257
Takao K and Miyakawa T: Light/dark transition test for mice. *Journal of Visualized Experiments*, Issue 1, 11/13/ 2006
- 0708081947
Ihara, M., Yamasaki, N., Hagiwara, A., Tanigaki, A., Kitano, A., Hikawa, R., Tomimoto H., Noda, M., Takanashi, M., Mori, H., Hattori, N., Miyakawa, T. and Kinoshita, M.: Sept4, a Component of Presynaptic Scaffold and Lewy Bodies, Is Required for the Suppression of α -Synuclein Neurotoxicity. *Neuron* 53(4): 519-533 (2007).
- 0708082025
Takao, K., Yamasaki, N. and Miyakawa, T.: Impact of brain-behavior phenotyping of genetically-engineered mice on research of neuropsychiatric disorders. *Neuroscience Research*, 58 (2) : 124-132, (2007)
- 708082101
Aiba, A., Inokuchi K., Ishida Y., Itoharu, S., Kobayashi, K., Masu, M., Mishina, M., Miyakawa, T., Mori, H., Nakao, K., Obata, Y., Sakimura, K., Shiroishi, T., Wada, K. and Yagi, T.: Mouse liaison for integrative brain research, *Neuroscience Research*, 58, 103-104, (2007)
- 0801292050
Hattori S, Hashimoto R, Miyakawa T, Yamanaka H, Maeno H, Wada, K, Kunugi.: Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi. *Behavioural Brain Research* 180(1), 69-76, (2007)
- 0801292054
Shibata, M., Yamasaki, N., Miyakawa, T., Ohtani, R., Ihara, M., Takahashi, R., and Tomimoto, H.: Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 38(10), 2826-32, (2007)
- 0801292059
Sano, H., Nagai, Y., Miyakawa, T., Shigemoto, R., Yokoi, M.: Increased social interaction in mice deficient of the striatal medium spiny neuron-specific phosphodiesterase 10A2. *J Neurochem*. 2007 Dec 6 [Epub ahead of print]
- 0801292107
Ogawa, M., Miyakawa, T., Nakamura, K., Kitano, J., Furushima, K., Kiyonari, H., Nakao, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S.: Altered sensitivities to morphine and cocaine in scaffold protein tamalin knock out mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(37), 14789-14794, (2007)
- 0801292122
Niemann, S., Kanki, H., Fukui, F., Takao, K., Fukaya, M., Hynynen, MN., Churchill, MJ., Shefner, JM., Bronson, RT., Watanabe, M., Brown, RH., Jr., Miyakawa, T., Itoharu, S., Hayashi, Y.,: Genetic ablation of NMDA receptor subunit NR3B in mouse reveals motoneuronal and non-motoneuronal phenotypes. *Eur J Neurosci*. 26 (6), 1407-1420, (2007)

<ホームページ>

<http://behav.hmro.med.kyoto-u.ac.jp/>

マウスの網羅的行動テストバッテリーに用いる実験設備・施設などの紹介 (京都大学医学研究科 先端技術センター)