

ENU 変異マウスを用いた行動異常発症に関わる遺伝子の機能解析

●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) 理化学研究所バイオリソースセンター

<研究の目的と進め方>

「脳で発現する遺伝子の機能の最終アウトプットレベルは行動である」との発想から、これまで各種の遺伝子改変マウスについて「網羅的行動テストバッテリー」を用いて解析することで遺伝子の新規な機能を明らかにしてきた。その中で、精神疾患モデルマウスとでも呼ぶべき、顕著な行動異常を示すマウスの系統を複数同定した。中でも顕著な行動異常を示す CaMKII α ヘテロノックアウトマウスの脳の海馬歯状回においては、神経新生が増加している一方で、ほぼ全ての神経細胞のステージが成熟神経細胞まで達していないという、驚くべき現象（未成熟な海馬歯状回）を見出した。

本研究の目的は、化学変異源 ENU によって作製された突然変異マウスについて、網羅的行動解析を行うことによって精神疾患様の行動異常を示すマウスを選び出し、さらにその脳を解析することで精神疾患様の行動異常を示すマウスに共通する中間表現型を明らかにすることである。精神疾患様の行動異常を示すマウスの解析から出発して、etiology と病態との関係がはっきりした「マウスの精神疾患」から「ヒトの精神疾患」の研究に結びつけるという戦略は、他に類をみないユニークなものであり、それと同時に、現在は症状で分類されているヒトの精神疾患を「生物学的原因に基づく診断」によって分類し直すことを可能にすることも期待しうる。

<2008 年度の研究の当初計画>

連携研究者である若菜・榎藤らは、理研 GSC が「大規模ミュータジェネシスプロジェクト」で作出した化学変異原 ENU による突然変異マウスの中から本研究を遂行するのに必要なミュータントマウスを検索して提供する。研究代表者である宮川と連携研究者の高雄は、そのマウスを行動実験専用施設に受け入れて、網羅的行動テストバッテリーを用いて行動表現型を詳細に解析する。さらに、行動実験後のマウスの脳の海馬を採取して、ジーンチップ、リアルタイム PCR により「未成熟な海馬歯状回」を特徴づけるバイオマーカー（遺伝子）について発現レベルを解析する。また、免疫組織化学染色、形態学的解析により、海馬ニューロンの樹状突起の数・長さ・分枝パターンやスパインの形態・密度などを解析する。

これまでに理研から送られた変異マウスで、顕著な行動異常・hyper-active な phenotype を示すある系統では、一部の行動解析が進み、さきに論文発表したカルシニューリン (CN) の前脳特異的欠損マウスと酷似した行動レベルの表現型のパターンを示すことが確認されている。行動データを取得後、脳の海馬の解析を進めていく。また、ヒトの統合失調症に対応するモデルマウスである DISC1 変異マウスについても、理研から供給できるようになれば、これを受け入れて解析する。さらに、生命システム情報の先の公募課題（平成 17, 18-19 年度）でスクリーニングした CN 関連遺伝子についても、引き続き ENU 変異マウスのスクリーニングを継続し、解析の候補となる変異マウスの系統を得る。

<2008 年度の成果>

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 M100174 (理研 BRC 登録番号:GSC0036) について網羅的行動解析を行った。この変異マウスは前年度までの解析で活動性の亢進、不安様行動の低下などの精神疾患様の行動異常があることが分かっている。本年度は主に認知機能についての解析を行った。作業記憶を調べる 8 方向放射状迷路課題ではコントロールマウスと同様にトレーニングによって迷路先端に置かれた餌を効率よく得ることが出来るようになった。試行の途中で 30 秒間の遅延を入れたところ、コントロールマウスに比べてわずかだが有意に成績の低下が見られ、軽度ではあるが作業記憶の低下が示唆される結果が得られた。また、文脈記憶を調べる恐怖条件付けテストでは電気ショック刺激を与えた翌日に同じ実験装置に入れたところ変異マウスはコントロールマウスに比べてすくみ反応が有意に少なく、変異マウスでは文脈記憶に障害があることが示唆された。以上より、変異マウスは活動性の亢進、不安様行動の低下といった情動性の異常だけではなく、認知機能にも異常があることが明らかになった。これらの行動異常は精神疾患と関連が深く、今回解析した変異マウスは精神疾患のモデルマウスとしての有用性が期待できる。また、行動解析で得られたデータは JST のバイオフィォマティクス推進事業 (BIRD) 「マウスを用いた脳機能表現型データベースの開発」プロジェクトによって構築した脳表現型データベースに登録しており、登録ユーザーはデータを閲覧することが出来るようになっている。

<国内外での成果の位置づけ>

ゲノムシークエンスが同定されて以来、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だが、研究代表者らの行動解析施設は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 70 以上の研究室と共同研究を進め、現在までに、90 系統、約 6000 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、大変ユニークであるといえる。

<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 7500 匹のスクリーニングについては、先の公募課題から引き継いだ 5 種類の遺伝子のうち、3 種類の遺伝子 24 領域中 18 領域 (延べ 50Mbp) の検索が完了し、13 の変異が発見されたがコード領域 (延べ 16Mbp) では 1 つのミスセンス変異だった。一般的な ENU 変異のコード領域での検出頻度と比較してあきらかに検出数が少なく、淘汰圧 (胎生致死など) が影響している可能性が考えられた。

<今後の課題>

ENU 変異マウスでは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、その行動を網羅的に解析することにより効率よく解析することができる。理研では従来のジーンドリブ法の変異検出システムの精度を上げるために、200bp以下の短いPCR産物の変異をより鋭敏に検出可能にする High Resolution Melt(HRM)法を取り入れた高速スクリーンシステムが開発されており、スクリーニング精度の向上が期待される。今後、未検出の候補遺伝子に加え、精神疾患の疾患感受性候補遺伝子として IL1 β 、MTFHR、TP53なども検索対象とすることを検討している。また、理研のENU変異マウスライブラリーでは Disc1 遺伝子に点変異をもつ2種の mutant マウスが開発され、統合失調症と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したい。

<成果公表リスト>

1. 0606191436
Powell CM, Miyakawa T: "Schizophrenia- relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder?", *Biological Psychiatry*, 59(12), 1198-207, (2006)
2. 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)
3. 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)
4. 0701191257
Takao K and Miyakawa T: Light/dark transition test for mice. *Journal of Visualized Experiments*, Issue 1, 11/13/ 2006
5. 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).
6. 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)
7. 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)
8. 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*. 105(2), 546-556(2008)
9. 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)
10. 0801292122
Niemann, S., Kanki, H., Fukui, F., Takao, K., Fukaya, M., Hynnen, 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)
11. 0901141914
Hung AY, Futai K, Sala C, Valtchanoff JG, Ryu J, Burgoon M, Kidd FL, Sung CC, Miyakawa T, Bear MF, Weinberg RJ, Sheng M. Smaller Dendritic Spines, Weaker Synaptic Transmission but Enhanced Spatial Learning in Mice Lacking Shank1. *Journal of Neuroscience*, 28(7), 1697-1708(2008)
12. 0901141911
Hori Y, Yamasaki N, Miyakawa T, Shiosaka S. Increased anxiety-like behavior in neuropsin (kallikrein-related peptidase 8) gene-deficient mice. *Behavioral Neuroscience*, 122(3), 498-504 (2008)
13. 0901141908
Sakae N, Yamasaki N, Kitaichi K, Fukuda T, Yamada M, Yoshikawa H, Hiranita T, Tatsumi Y, Kira J, Yamamoto T, Miyakawa T, Nakayama KI. Mice lacking the schizophrenia-associated protein FEZ1 manifest hyperactivity and enhanced responsiveness to psychostimulants. *Human Molecular Genetics*, 17(20): 3191-3203 (2008)
14. 0901141925
Ikeda M, Hikita T, Taya S, Uruguchi-Asaki J, Toyo-oka K, Wynshaw-Boris A, Ujike H, Inada T, Takao K, Miyakawa T, Ozaki N, Kaibuchi K, Iwata N. Identification of YWHAE, a gene encoding 14-3-3epsilon, as a possible susceptibility gene for schizophrenia. *Human Molecular Genetics*, 17(20): 3212-3222 (2008)
15. 0901141928
Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itoharu S, Kageyama R. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience*, 11, 1153-1161(2008)
16. 0901141921
Yamasaki N*, Maekawa M*, Kobayashi K*, Kajii Y*, Maeda J*, Soma M*, Takao K*, Tanda K, Ohira K, Toyama T, Kanzaki K, Fukunaga K, Sudo Y, Ichinose H, Ikeda M, Iwata N, Ozaki N, Suzuki H, Higuchi M, Suhara T, Yuasa S, Miyakawa T. (*These authors contributed equally to this work.), Alpha-CaMKII deficiency causes immature dentate gyrus, a novel candidate endophenotype of psychiatric disorders, *Molecular Brain*, 1:6 (2008)

<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)

<データベース>

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

JST バイオインフォマティクス推進事業「マウスを用いた脳機能表現型データベースの開発」によるデータベース