

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18300141  
 研究課題名 (和文) ラット LEXF/FXLE リコンビナント系統を用いたキンドリング感受性座位の同定  
 研究課題名 (英文) Amygdala kindling susceptibility loci identified with rat LEXF/FXLE recombinant inbred strains  
 研究代表者  
 庫本 高志 (KURAMOTO TAKASHI)  
 京都大学・大学院医学研究科・准教授  
 研究者番号：20311409

## 研究成果の概要：

実験動物の脳の特定位点を後発射を引き起こすような電流値で毎日刺激すると、顔面けいれん、咀嚼などの行動上のけいれん発作が現れ、最終的に全般発作となる。この現象は、キンドリングと呼ばれ、ヒトてんかんにおける、てんかん原性の獲得から発作の進展という過程を理解する上で有用な実験モデルとされている。本研究では、ラット LEXF/FXLE リコンビナント近交系 (RI 系統) を用いてキンドリング感受性座位の同定を目的とした。RI 系統 7 系統と親系統 (LE/Stm, F344/Stm) に対してキンドリングを誘発し、発作閾値、各刺激における後発射持続時間、キンドリング獲得までの刺激回数 (kindling rate) からなる表現型値を決定した。その結果、発作閾値、各刺激における後発射持続時間では系統差がなかったが、kindling rate には系統差があった。一方、1,033 個の SNP マーカーからなる遺伝型を決定した。連鎖解析によって、kindling rate と相関する染色体領域を第 2 染色体に見出し、Amygdala kindling susceptibility 1 (*Aks1*) と *Aks2* と名付けた。*Aks1*, *Aks2* はキンドリングの進展に関与する遺伝子座であり、ヒトてんかんにおける重大な関心事であるてんかんの全般化に関与する遺伝的要因を含むと考えられる。本研究は、キンドリング発症に係わる遺伝子座が特定し、発作の全般化に関して遺伝的要因が存在することを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2007 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：ラット、リコンビナント近交系、疾患モデル、てんかん、QTL、キンドリング

## 1. 研究開始当初の背景

キンドリングは、実験動物の脳の特定部位にけいれん閾値以下の微弱な電気刺激を毎日繰り返し与えると、数日後には、脳波に発作波が生じ、次いで顔面けいれん、咀嚼などの行動上のけいれん発作が現れ、最終的に全般発作となる現象をいう。ヒトてんかんにおける、てんかん原性の獲得から発作の進展という過程を理解する上で有用な実験モデルである。

このキンドリングをアウトブリードのラットに適用してキンドリング易発性・抵抗性の系統が選抜育種されていたことから、キンドリング感受性遺伝子の存在が示唆されていた。これは、ヒトてんかんの“発症しやすさ”、“全般化しやすさ”に係る遺伝子が存在し、キンドリング感受性遺伝子の同定を通じて、それらが同定される可能性を示唆している。

リコンビナント近交系は、多因子疾患や量的形質に関与する遺伝子の遺伝解析に有用な近交系群である。日本で開発された LEXF/FXLE ラットリコンビナント近交系は、LE/Stm と F344/Stm を親系統とし、世界最多の 34 系統のセットからなる。ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat) のフェノームプロジェクトによって、109 項目からなる特性プロファイルと、357 個の SSLP マーカーからなる遺伝子型プロファイル(Strain Distribution Pattern: SDP)の作成進められ、量的形質座位 (Quantitative Trait Loci, QTLs) 解析における有用性が検討されていた。

## 2. 研究の目的

リコンビナント近交系を用いた QTL 解析では、遺伝型と表現型との相関解析(連鎖解析)が行われる。

本件研究の目的は、1) 遺伝型、すなわち、Strain Distribution Pattern (SDP)を決定する、2) 各系統に対して、キンドリング誘発試験を行い、あらかじめ設定した形質(発作閾値、各刺激における後発射持続時間、キンドリング獲得までの刺激回数(kindling rate))について、表現型値を決定する、3) 遺伝型値と表現型値の相関解析を行い、キンドリング感受性遺伝子座位を特定する、からなる。

## 3. 研究の方法

### 1) Strain Distribution Pattern (SDP) の決定

NBRP-Rat で公表されている 357 個の SSLP マーカーについて、LE/Stm と F344/Stm 間の多型を検査し、多型のあるものについて、SDP を作成した。より詳細な SDP を作成するために、EURATool プロジェクトで開発された 20,283 個の SNP マーカーについて、LE/Stm と F344/Stm 間の多型を検査し、多型のあるものについて、SDP を作成した。

### 2) キンドリングに係わる表現型値の決定 <動物>

LEXF/FXLE リコンビナント近交系の親系統 LE/Stm (n=6) と F344/Stm (n=10)、および、リコンビナント近交系のうち 7 系統、LEXF2B (n=6)、LEXF6B (n=7)、LEXF7B (n=6)、LEXF10C (n=6)、LEXF11 (n=6)、FXLE13 (n=6)、FXLE16 (n=5) の雄個体を使用した。

#### <発作閾値の決定>

10~11 週齢時にネブタール投与による深麻酔下で刺激および記録用双極電極を右扁桃核に、記録用電極を頭蓋骨上に埋設し、術後 2 週間経過した後に扁桃核電気刺激を開始した(図 1)。刺激は 25 $\mu$ A より開始し、10 分ごとに 25 $\mu$ A ずつ増強したものを加え、脳波を観察した。脳波上に 5 秒以上の後発射(図 2)が出現した電流量を閾値とし、キンドリング 1 回目と数えた。

#### <キンドリング誘発>

閾値決定の翌日より 1 日 1 回、一定電流(500 $\mu$ A、1 相性矩形波、1 秒)での扁桃核キンドリングを行った(図 1)。電気刺激後、ラットの行動を観察し、Racine のキンドリング獲得分類のスコア(Stage1~5)を評定した。同時に、各刺激に対する後発射持続時間を測定した。Stage5 を示した個体は、キンドリングを獲得したものとみなし、それまでの刺激回数を kindling rate として記録した。

### 3) 連鎖解析

測定項目について、QTL Cartographer により、1,033 個の SNP マーカーを用いて連鎖解析を行った。

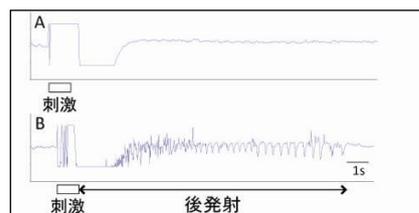
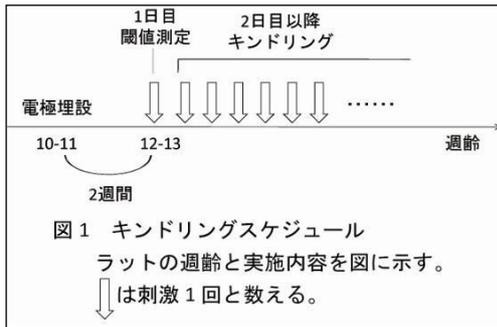


図 2 後発射

扁桃核 - 皮質で測定した脳波を示す。A: 電流が閾値に達しない時は後発射を誘発しない。B: 閾値以上の電流刺激で後発射を誘発する。



#### 4. 研究成果

##### 1) SDP の作成

SSLP マーカーについて、259 マーカーで LE/Stm と F344/Stm 間で多型があった。259 マーカー中、3 マーカーはマップ位置が重複していたので、256 マーカーを用いて連鎖解析用の SDP を作成した。SNP マーカーについて、5,778 マーカーで LE/Stm と F344/Stm 間で多型があった。重複分をのぞく 1,033 マーカーを用いて連鎖解析用の SDP を作成した。

##### 2) キンドリングに係わる表現型値の決定 <発作閾値の決定>

閾値は低い系統で  $108 \pm 11 \mu\text{A}$  (LE/Stm、平均  $\pm$  SEM)、高い系統で  $170 \pm 21 \mu\text{A}$  (F344/Stm) その時の後発射持続時間は短い系統で  $7.1 \pm 1.8$  秒 (LEXF2B)、長い系統で  $10.7 \pm 1.3$  秒 (F344/Stm) であった。いずれの系統間にも差はなかった (ANOVA、図 3)。 <キンドリング誘発>

Kindling rate は、小さい系統で  $3.9 \pm 0.3$  回 (F344/Stm)、大きい系統で  $10.3 \pm 0.7$  回 (LEXF10C) であり、系統間に差があった (ANOVA、図 4)。多重比較検定を行ったところ、系統差は階段状に見られた。

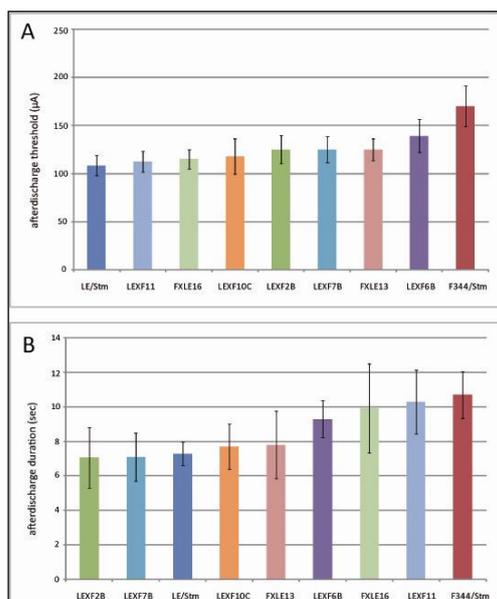


図3 閾値測定結果 A: 閾値と B: その時の後発射持続時間 (平均  $\pm$  SE)

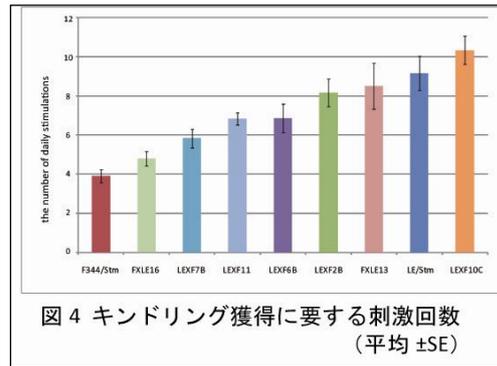


図4 キンドリング獲得に要する刺激回数 (平均  $\pm$  SE)

##### 3) 連鎖解析

各個体の測定値を系統ごとにとりまとめ、平均値を系統の表現型値とした。1,033 個の SNP マーカーからなる SDP を用いて QTL 解析を行った。系統差のあった kindling rate について QTL 解析を行った結果、第 2 染色体上に 2 つの遺伝子座 (LOD スコア 5.8 と 3.2) を検出し、それぞれを Amygdala kindling 1 (*Aks1*) と *Aks2* とした (図 5)。

後発射閾値は脳局所の興奮性に、kindling rate は局所興奮性の脳全体への進行に関連していると考えられている。本研究から、脳の局所の興奮性とその全般化には、異なる遺伝要因が関与していることが示唆された。*Aks1* には 55 個、*Aks2* には 72 個の遺伝子が存在し、そのうち脳で発現する遺伝子がそれぞれ 23 個と 26 個存在していた。これらの中にはてんかん誘発実験やけいれんに関連のある遺伝子が含まれる。これらの中に脳局所の興奮性を全般化させるてんかん関連遺伝子が存在していると考えられた。

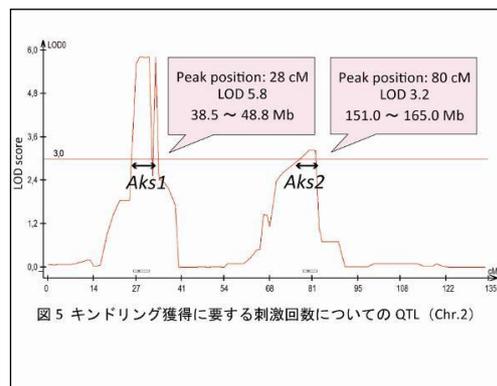


図5 キンドリング獲得に要する刺激回数についての QTL (Chr.2)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 17 件)

- Mashimo T, Voigt B, Tsurumi T, Naoi K, Nakanishi S, Yamasaki K, Kuramoto T, and Serikawa T

- A set of highly informative rat simple sequence length polymorphism (SSLP) markers and genetically defined rat strains. *BMC Genetics* 7: 19, 2006
2. Gohma H, Kuramoto T, Kuwamura M, Okajima R, Tanimoto N, Yamasaki K, Nakanishi S, Kitada K, Makiyama T, Akao M, Kita T, Sasa M, and Serikawa T WTC deafness Kyoto (dfk): a rat model for extensive investigations of Kcnq1 functions. *Physiol Genomics* 24(3):198-206, 2006
  3. Mori M, Li G, Abe I, Nakayama J, Guo Z, Sawashita J, Ugawa T, Nishizono S, Serikawa T, Higuchi K, and Shumiya S. Lanosterol synthase mutations cause cholesterol deficiency-associated cataracts in the Shumiya cataract rat. *J Clin Invest* 116: 395-404, 2006
  4. Tanaka K, Shirakawa H, Okada K, Konno M, Nakagawa T, Serikawa T, Kaneko S. Increased Ca<sup>2+</sup> channel currents in cerebellar Purkinje cells of the ataxic groggy rat. *Neurosci Lett.* 426(2):75-80, 2007
  5. Yan HD, Ishihara K, Hanaya R, Kurisu K, Serikawa T, Sasa M. Voltage-dependent calcium channel abnormalities in hippocampal CA3 neurons of spontaneously epileptic rats. *Epilepsia.* 48(4):758-764, 2007
  6. Gohma H, Kuramoto T, Matalon R, Surendran S, Tying S, Kitada K, Sasa M, and Serikawa T Absence-like and tonic seizures in Aspartoacylase/Attractin double-mutant mice. *Exp Anim* 56(2): 161-165, 2007
  7. Tokuda S, Kuramoto T, Tanaka T, Kaneko S, Takeuchi IK, Sasa M, and Serikawa T The ataxic groggy rat has a missense mutation in the P/Q-type voltage gated Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 1A subunit gene and exhibits absence seizures. *Brain Res* 1133(1): 168-177, 2007.
  8. Kashiwazaki N, Seita Y, Naoi K, Takizawa A, Kuramoto T, and Serikawa T Generation of rat offspring derived from cryopreserved spermatozoa in Japanese National Bioresources *Reprod Fertil Dev.* 19(1):124-125, 2007.
  9. Genetic dissection of the LEXF/FXLE recombinant inbred strains. Kuramoto T, Voigt B, Mashimo T, Sasaki Y, Hokao R, Serikawa T. *Physiol Res.* 57:52P, 2008.
  10. The STAR Consortium\*, Saar K, Beck A, Bihoreau MT, Birney E, Brocklebank D, Chen Y, Cuppen E, Demonchy S, Dopazo J, Flicek P, Foglio M, Fujiyama A, Gut IG, Gauguier D, Guigo R, Guryev V, Heinig M, Hummel O, Jahn N, Klages S, Kren V, Kube M, Kuhl H, Kuramoto T, Kuroki Y, Lechner D, Lee YA, Lopez-Bigas N, Lathrop GM, Mashimo T, Medina I, Mott R, Patone G, Perrier-Cornet JA, Platzer M, Pravenec M, Reinhardt R, Sakaki Y, Schilhabel M, Schulz H, Serikawa T, Shikhagaie M, Tatsumoto S, Taudien S, Toyoda A, Voigt B, Zelenika D, Zimdahl H, Hubner N. SNP and haplotype mapping for genetic analysis in the rat. *Nat Genet.* 40(5):560-566, 2008.
  11. Aitman TJ, Critser JK, Cuppen E, Dominiczak A, Fernandez-Suarez XM, Flint J, Gauguier D, Geurts AM, Gould M, Harris PC, Holmdahl R, Hubner N, Izsvák Z, Jacob HJ, Kuramoto T, Kwitek AE, Marrone A, Mashimo T, Moreno C, Mullins J, Mullins L, Olsson T, Pravenec M, Riley L, Saar K, Serikawa T, Shull JD, Szpirer C, Twigger SN, Voigt B, Worley K. Progress and prospects in rat genetics: a community view. *Nat Genet.* 40(5):516-522, 2008
  12. Mashimo T, Yanagihara K, Tokuda S, Voigt B, Takizawa A, Nakajima R, Kato M, Hirabayashi M, Kuramoto T, Serikawa T. An ENU-induced mutant archive for gene targeting in rats. *Nat Genet.* 40(5):514-515, 2008.
  13. Hanaya R, Kiura Y, Kurisu K, Sakai N, Serikawa T, Sasa M N-Acetyl-l-aspartate activates hippocampal CA3 neurons in rodent slice preparations. *Brain Res Bull.* 75(5):663-667, 2008.
  14. Kuwamura M, Okajima R, Yamate J, Kotani T, Kuramoto T, Serikawa T Pancreatic metaplasia in the gastro-achlorhydria in WTC-dfk rat, a potassium channel Kcnq1 mutant. *Vet Pathol* 45(4): 586-591, 2008.

15. Kuramoto T, Nakanishi S, Serikawa T. Functional polymorphisms in inbred rat strains and their allele frequencies in commercially available outbred stocks. *Physiol Genomics* 33: 205-211, 2008.
16. Matsuyama M, Kato K, Higo-Moriguchi K, Yamada T, Kuramoto T, Kuroda M. Establishment of thymoma-prone congenic rat strain, ACI.BUF/Mna-Tsr1/Tsr1. *J Cancer Res Clin Oncol.* 134(7): 789-792, 2008
17. Voigt B, Kuramoto T, Mashimo T, Tsurumi T, Sasaki Y, Hokao R, Serikawa T. Evaluation of LEXF/FXLE rat recombinant inbred strains for the genetic dissection of complex traits. *Physiol Genomics* 32(3): 335-342, 2008

〔学会発表〕（計 14 件）

1. Recombinant Inbred Strains & Genetic Dissection of Phenotypes  
Voigt B, Kuramoto T, Tsurumi T, Mashimo T, Sasaki Y, Hokao R, Serikawa T. XVIth International Workshop on Rat Genetic Systems, Melbourne, 2006 December 1-2
2. The ataxic groggy rat has a missense mutation in the P/Q-type voltage gated Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha 1A$  subunit gene and exhibits absence seizures  
Tokuda S, Kuramoto T, Tanaka K, Kaneko K, Takeuchi I, Sasa M, Serikawa T. XVIth International Workshop on Rat Genetic Systems, Melbourne, 2006 December 1-2
3. The LEXF/FXLE rat recombinant inbred strain set: a newly enhanced tool for genetic dissection of complex traits  
Kuramoto T, Voigt B, Tsurumi T, Mashimo T, Sasaki Y, Hokao R, Serikawa T. The 2nd Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations, Jeju, Korea, Aug29 - Sep1, 2006
4. Genetic dissection of the LEXF/FXLE recombinant inbred strains: A SNP based QTL study.  
Voigt B, Mashimo T, Kuramoto T, Takizawa A, Yamasaki K, Nakanishi S, Serikawa T. The 2007 meeting on Rat Genomics & Models, Dec 6 - 9, 2007. Cold Spring Harbor, New York, USA.
5. Genetic dissection of the LEXF/FXLE recombinant inbred strains.  
Kuramoto T, Voigt B, Mashimo T, Sasaki Y, Hokao R, Serikawa T. 13th International SHR symposium, June 20 - 22, 2008. Prague, Czech Republic.
6. ラット FXLE/LEXF RI 系統セットの活用  
庫本高志, ビルガーフォークト, 直井国子, 山崎賢一, 中西 聡, 鶴見東志子, 真下知士, 左近上博司, 西森司雄, 外尾亮治, 芹川忠夫  
第20回 日本糖尿病動物研究会、東京、2006.2.9-10
7. 電位依存性カリウムチャンネル *Kcnq1* 遺伝子変異ラット (deafness Kyoto ラット)  
庫本高志, 郷間宏史, 桑村 充, 中西 聡, 北田一博, 赤尾昌治, 牧山 武, 北 徹, 笹 征史, 芹川忠夫  
第53回 日本実験動物学会総会、神戸、2006.5.11-13
8. ラット FXLE/LEXF リコンビナント近交系を用いた量的形質の遺伝解析  
庫本高志, Birger Voigt, 鶴見東志子, 真下知士, 佐々木敬幸, 外尾亮治, 芹川忠夫  
第23回 日本疾患モデル学会、渋川、2006.11.30
9. ラット近交系における RT1 領域の遺伝子型プロファイル  
高木弓枝, 庫本高志, 鶴見東志子, 中西聡, 真下知士, 増井則夫, 芹川忠夫  
第54回 日本実験動物学会総会、東京、2007.5.23-25
10. 毛胞と乳腺の発育不全を示す Sparse and wavy hair ラットの原因遺伝子の同定  
庫本高志, 芹川忠夫  
第54回 日本実験動物学会総会、東京、2007.5.23-25
11. 脂質代謝・糖質代謝におけるラットリソースの活用  
シンポジウム 脂質代謝・糖質代謝を制御するメタボリックセンサーの分子機構  
庫本高志  
日本農芸化学会 2008 年度大会、名古屋、2008.3.29

12. ラット機能多型のジェノタイプング  
中西 聡、庫本高志、芹川忠夫  
第55回 日本実験動物学会総会、仙台、  
2008.5.15-17
13. 日本産野生由来 DOB ラットの遺伝的特徴  
岡島涼子、庫本高志、真下知士、鶴見東志子、Zhang Zouming、目加田和之、夏目明香、町田侑平、織田銃一、芹川忠夫  
第55回 日本実験動物学会総会、仙台、  
2008.5.15-17
14. ラット LEXF/FXLE リコンビナント近交系を用いた QTL 解析  
庫本高志 1、北斗美留賀 1、真下知士 1、鶴見東志子 1、佐々木敬幸 2、外尾亮治 2、芹川忠夫  
第55回 日本実験動物学会総会、仙台、  
2008.5.15-17

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

庫本 高志 (KURAMOTO TAKASHI)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：20311409

### (2)研究分担者

芹川 忠夫 (SERIKAWA TADAO)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：30025655

外尾 亮治 (HOKAO RYOJI)

動物繁殖研究所・理事長  
研究者番号：80156992

### (3)連携研究者