

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24240048

研究課題名(和文) ヒト脳機能解明への道程としての遺伝子改変ラット作製法の開発

研究課題名(英文) Development of new methods for a gene-manipulated rat for the analysis of human brain function

研究代表者

崎村 建司(sakimura, kenji)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：40162325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、脳機能解析に利用できる遺伝子改変ラットを安価かつ容易に作製する方法を開発し、ラットを研究リソースとして利用できる基盤を作ることである。このために、ラットES細胞の培養条件、相同組換えを用いた迅速な遺伝子改変方法、確実に生殖細胞への分化をするキメラ作製法の開発おこない、遺伝子改変ラット樹立技術を確立した。

さらにラットES細胞を用いて、マウス・ラット異種間キメラ法によりラット精子を作出するために、コンディショナル組換え法により精巣形成不全マウス作出し、高効率でラット精巣組織をマウスで作出することに成功した。本研究により、効率的に遺伝子組換えラットを作る技術が開発された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to develop an efficient and low-cost method to generate gene-manipulated rats for the analysis of brain functions, so that we can provide the research community of this country with gene-modified rats as useful animal resources. For this purpose, we established an optimum culture condition for rat ES cells, a rapid gene-manipulated method using homologous recombination, and a generation method of chimeras that efficiently differentiate to germ cells. Thus, we succeeded in stable generation of gene-manipulated rats. In addition, in order to produce rat sperm from the rat ES cells using our unique mouse-rat interspecies chimeric method, we generated a spermatogenesis-impaired mouse using the conditional recombination technique, and were able to generate rat spermary tissue in a mouse with high efficiency. Our project successfully developed an efficient technique to generate gene-modified rats.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：ラットES細胞 遺伝子組換え 異種動物間キメラ ノックアウトラット 顕微授精

## 1. 研究開始当初の背景

ノックアウトマウスに代表される遺伝子改変マウスは、現在脳機能を解析する上でなくてはならないリソースとなっている。一方、ヒトの高次脳機能や病態の理解には齧歯類では不十分であるという理由から、サルでの遺伝子組み換え法の開発が進められているが、未だその手法は確立していない。飼育だけでも高額な経費がかかることや倫理的な問題もあり、一般の研究者が遺伝子改変霊長類を解析手段として使えるようになるとは考えにくい。遺伝子改変マウスが登場してからその研究リソースとしての地位が低下したかに見えるラットだが、この動物は電気生理学や行動解析学を中心に広く使用されてきており、脳機能解析に無くてはならない動物である。特に、マウスでは困難な高次脳機能解析のための行動課題や生理学的な実験も多く、これまでも遺伝子改変ラットは待望されてきた。しかし、ラット ES 細胞の樹立が困難であったため、その作製はほとんど不可能であった。また、近年、遺伝子編集法を用いたノックアウト法が開発されたが、細かな遺伝子改変が出来ないことや高い経費、さらに作製した動物の所有権が作製会社にあることなどから十分に利用されていない。最近ラット ES 細胞を用いたノックアウトラットが報告され、この手法が原理的に可能であることが明らかになった。我々はマウス C57BL/6 系統由来 ES 細胞株を樹立した経験をもとに、ラットにおいても ES 細胞の樹立をすべく長期に渡り挑戦してきた。その結果、多分化能に関与するシグナル分子の阻害剤と培地の組成に工夫を加えることで、Norway Brown、Wistar 及び Sprague-Dawley ラットから ES 様細胞株の樹立に成功した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脳機能解析及び病態解明に

利用できる遺伝子改変ラットを安価かつ容易に作製する方法を確立し、ノックアウトマウスと同様な感覚でノックアウトラットを研究リソースとして利用できる基盤を作ることである。そのために、すでに樹立したラット ES 細胞が未分化状態を保つ培養条件、相同組換えを用いた迅速な遺伝子改変方法、確実に生殖細胞への分化をするキメラ作製法を確立する。さらに、マウス・ラット異種間キメラ法を用いたラット ES 細胞由来生殖細胞（精子）の作出法を開発する。

## 3. 研究の方法

ラット ES 細胞の未分化状態を保ち相同組換えが出来る培地の検討をおこなった結果、N2B272iR 培地を開発した。その組成は、neurobasal media に N2 を添加したものと advanced DMEM/F12 に B27 を添加したものを等量混和し、そこに 1mM 2-mercaptoethanol、1mM glutamine、3mM CHIR99021、1mM PD0325901、 $10^3$ units rat LIF、10mM forskolin である。培養は、マウスの線維芽細胞をフィーダーとして、継代等はマウス ES 細胞培養法に準拠した。また相同組換え方法についてもマウスの方法に準拠し、ベクターの構築やスクリーニングをおこなった。ラット胚を用いたキメラ作製は、生後 4 週の SD ラットに過剰排卵を誘導し、DA 及び BN ラットと交配させ、3.5 日桑実胚を取得した。この胚を簡易ガラス化法にて凍結し実験に供した。凍結胚を融解後、インジェクション法及びアグリゲーション法にて ES 細胞を導入してキメラ胚を作製した。作製したキメラ胚は胚盤胞まで培養後、偽妊娠誘起を行ったレシピエントラットの子宮へ移植しキメララットを得た。

異種間キメラを確実に遂行させるために、細胞毒遺伝子の DTA を Cre 依存的に発現するマウスと精巣で選択的に Cre に発現するマウスを交配させ、精巣欠損する ES 細胞移植受容胚の開発をおこなった。この精巣欠損マウ

ス胚盤胞に、CAG プロモーターで蛍光タンパク質 Venus 遺伝子を発現するトランスジェニックラットから樹立した SDV83 ラット ES 細胞を移植して異種間キメラ動物を作製した。

#### 4. 研究成果

本研究開発ではまず、ラット ES 細胞から同種間キメラ法を用いて遺伝子改変ラット作製法の条件を検討した。その結果、ラット ES 細胞を安定して培養するためには、いわゆる 2i の他にラット LIF と forskolin を加えることが有用であることが判明した。また、相同組換えによる遺伝子改変に用いる選択薬剤としては、薬剤の効きが速いピューロマイシンの方が使いやすいことが明らかになった。さらに、ネオマイシンを使うのであれば、CAG か EF1 プロモーターなどでネオマイシン耐性タンパク質を強く発現させないと十分な薬剤耐性が得られない。また、CRISPR/Cas9 を用いた効率的な組換え方法を開発した。

同種キメラ作製方法では、胚の採取が簡単な 3.5 日目の桑実胚を凍結保存して利用した。レシピエントの準備が出来たタイミングで胚を解凍して培養し、胚盤胞まで発生を進めたものに ES 細胞を注入する方法が最も効率よくキメララットが作出できることがわかった。また、蛍光タンパク質 venus を発現する SD 系統トランスジェニックラットから ES 細胞の樹立に成功しており、この細胞を用いてキメラを作ると毛色だけでなく、蛍光の強度でキメラ率が容易に判定できるシステムを構築した。これらの手法を用いてラット ES 細胞から安定して生殖系列遺伝するラットを樹立する方法が確立した。

本研究のもう一つの柱である、異種間キメラによるラット ES 細胞由来精子の作出のために、精巣組織ができないマウス受容胚の開発をコンディショナル遺伝子組換え法によりおこなった。Cre 依存的に細胞死を引き起

こす DTA 発現マウスと精巣組織選択的に Cre を発現するドライバーマウスを交配させて、精巣組織が全く形成されないマウスを樹立した。この胚に蛍光タンパク質を発現する SDV83 ラット ES 細胞を注入したキメラ動物では、いわゆる胚盤胞補完法により出来た精巣組織は ES 細胞由来のものである。実際にこれらのキメラマウスの精巣組織では、ほぼ全ての細胞が蛍光タンパク質を発現している（図 1 上）。さらにその精巣組織中には、精細管の構造が認められ精子の前駆細胞が認められた。しかし、精巣上体には成熟した精子は認められなかった。そこで、このキメラ動物の精細管の精子前駆細胞を用いて顕微授精による個体取得を現在進めている。

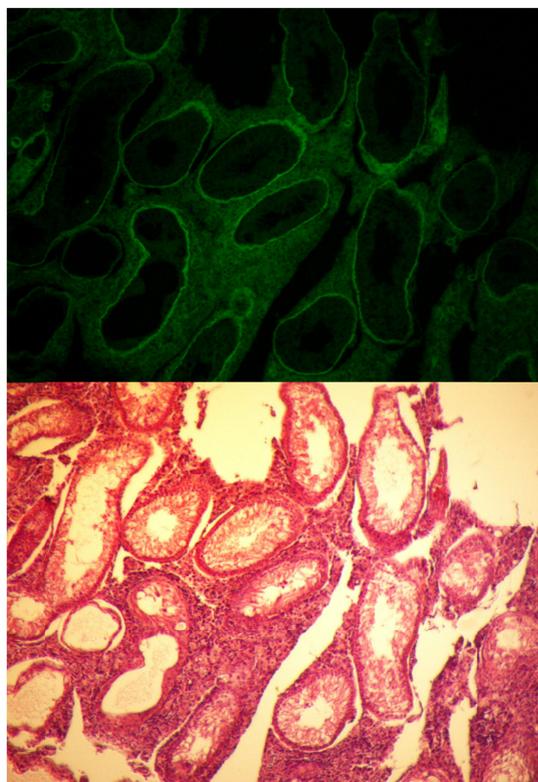


図1 上、キメラマウス精巣組織の蛍光タンパク質の検出。下、同視野の HE 染色（精細管の中に精子前駆細胞が認められる）。

本研究では、樹立したラット ES 細胞が、未分化状態を保ったままで遺伝子編集や相同組換えによる遺伝子改変が出来る条件を決定し、同種間キメラ法を用いた遺伝子改変ラット作製方法を確立した。またその過程で、ほぼ全ての組織で蛍光タンパク質を発現す

るSD系統ラット由来ES細胞株SDV83を樹立した。さらに、キメラ法により効率的に精子細胞を作出できる精巣組織欠損マウスの遺伝子背景を細胞性免疫欠損のヌードマウスのものにする大規模コロニーの構築が進められており、異種間キメラを容認する受容胚作出システムが整備できると考えている。また、ラット精子前駆細胞を用いた顕微授精システムの整備を進めており、系統的に遺伝子改変ラットを樹立する基盤が整備できると考えている。なお、これまでの研究開発で樹立した新規ES細胞や、キメラ作製方法など、可能なものは特許申請をおこなう予定である。

#### 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13件)

1. Ageta-Ishihara N, Yamazaki M, Konno K, Nakayama H, Abe M, Hashimoto K, Nishioka T, Kaibuchi K, Hattori S, Miyakawa T, Tanaka K, Huda F, Hirai H, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M: A CDC42EP4/septin-based perisynaptic glial scaffold facilitates glutamate clearance. *Nat Commun.* 2015 6:10090. doi: 10.1038/ncomms 10090. 査読あり
2. Watanabe-Iida I, Konno K, Akashi K, Abe M, Natsume R, Watanabe M, Sakimura K: Determination of kainate receptor subunit ratios in mouse brain using novel chimeric protein standards. *J Neurochem.* 2015 doi: 10.1111/jnc.13384. 査読あり
3. Kita Y, Yoshida K, Tokuoka SM, Hamano F, Yamazaki M, Sakimura K Kano M, Shimizu T.: Fever is mediated by conversion of endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol to prostaglandin E2. *PLoS One.* 2015 10(7):e0133663. doi:10.1371/journal.pone.0133663. eCollection 2015. 査読あり
4. Suzuki J, Sakurai K, Yamazaki M, Abe M, Inada H, Sakimura K, Katori Y, Osumi N: Horizontal basal cell-specific deletion of Pax6 impedes recovery of the olfactory neuroepithelium following severe injury. *Stem Cells Dev.* 2015 24(16):1923-33. doi: 10.1089/scd.2015.0011. 査読あり
5. Kakegawa W, Mitakidis N, Miura E, Abe M, Matsuda K, Takeo YH, Kohda K, Motohashi J, Takahashi A, Nagao S, Muramatsu S, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR, Yuzaki M: Anterograde c1ql1 signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum. *Neuron.* 2015 85(2):316-29. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.020. 査読あり
6. Tsutsumi S, Yamazaki M, Miyazaki T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M, Kitamura K: Structure-function relationships between aldolase C/Zebrin II expression and complex spike synchrony in the cerebellum. *J Neurosci.* 2015 35(2):843-52. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2170-14.2015. 査読あり
7. Yamazaki M, Le Pichon CE, Jackson AC, Cerpas M, Sakimura K, Searce-Levie K, Nicoll RA: Relative contribution of TARP $\alpha$ -2 and  $\alpha$ -7 to cerebellar excitatory synaptic transmission and motor behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 112(4):E371-9. doi: 10.1073/pnas.1423670112. 査読あり
8. Kaneko R, Abe M, Hirabayashi T, Uchimura A, Sakimura K, Yanagawa Y, Yagi T: Expansion of stochastic expression repertoire by tandem duplication in mouse Protocadherin- cluster. *Sci Rep.* 2014 4:6263. doi: 10.1038/ srep06263. 査読あり
9. Kawata S, Miyazaki T, Yamazaki M, Mikuni T, Yamasaki M, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kano M: Global scaling down of excitatory postsynaptic responses in cerebellar purkinje cells impairs developmental synapse elimination. *Cell Rep.* 2014 8(4):1119-29. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.014. 査読あり
10. Itoi K, Talukder AH, Fuse T, Kaneko T, Ozawa R, Sato T, Sugaya T, Uchida K, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Sakimura K: Visualization of corticotropin-releasing factor neurons by fluorescent proteins in the mouse brain and characterization of labeled neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology.* 2014 155(10):4054-60. doi: 10.1210/en.2014-1182. 査読あり
11. Konno K, Matsuda K, Nakamoto C, Uchigashima M, Miyazaki T, Yamasaki M, Sakimura K, Yuzaki M, Watanabe M: Enriched expression of GluD1 in higher brain regions and its involvement in parallel fiber-interneuron

synapse formation in the cerebellum. *J Neurosci*. 2014 34(22):7412-24.doi:10.1523/JNEUROSCI.0628-14.2014. 査読あり

12. Ikegami M, Uemura T, Kishioka A, Sakimura K, Mishina M: Striatal dopamine D1 receptor is essential for contextual fear conditioning. *Sci Rep*. 2014 4: 3976. doi: 10.1038/srep03976. 査読あり

13. Kawamura Y, Nakayama H, Hashimoto K, Sakimura K, Kitamura K, Kano M: Spike timing-dependent selective strengthening of single climbing fiber inputs to Purkinje cells during cerebellar development. *Nat Commun*. 2013 4:2732.doi: 10.1038/ncomms3732. 査読あり

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 中務胞, 夏目里恵, 崎村建司: ラット ES 細胞を用いた遺伝子改変動物作製の効率化: 受容胚系統の比較 2016/5/20 第 63 回 日本実験動物学会総会 ミューザ川崎 (神奈川県・川崎市)

2. 北芳博, 吉田憲司, 徳岡涼美, 浜野文三, 崎村建司, 狩野方伸, 清水孝雄: モノアシルグリセロールリパーゼによる脂質ホメオスタシスの制御 BMB2015 2015/12/4 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

3. 中務胞, 夏目里恵, 高田華子, 崎村建司: ラット ES 細胞神経生物学から遺伝子改変動物作製の効率化: 妊娠維持障害の改善 BMB2015 2015/12/1 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

4. Sat T, Sugaya T, Fuse T, Uchida K, Talukder A., Kono J, Sugimoto N, Yamagata S, Abe M, Yamazaki M, Fukuda A, Sakimura K, Itoi K: Dual effects of serotonergic inputs on the local circuits regulating the corticotropin-releasing factor neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: An electrophysiological study using the CRF-Venus delta neo mouse. *Neuroscience2015* 2015/10/19 Chicago, USA

5. Yamasaki M, Fukaya M, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Watanabe M: Molecular determinants underlying heterogeneity in AMPAR content across CA1 Schaffer collateral synapses. *Neuroscience2015* 2015/10/18 Chicago, USA

6. Nakamoto C, Natsume R, Nakatsukasa E, Abe M, Watanabe M, Sakimura K: Behavioral analysis of GluD1 deficient mice with the pure genetic background. *Neuroscience2015* 2015/10/18 Chicago, USA

7. Sakimura K: A unique western blot method to measure the number of glutamate receptor subunits. 25th Meeting of the ISN 2015/8/24 Cairns, Australia

8. 渡辺和泉, 今野幸太郎, 明石馨, 阿部学, 夏目里恵, 渡辺雅彦, 崎村建司: 低親和性カイニン酸受容体サブユニット、GluK2 及び GluK3 欠損マウスの行動解析 Analysis of behavioral phenotypes in low affinity kainate-type subunits deficient mice. 第 38 回日本神経科学会 2015/7/29 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

9. 菅谷祐樹, 山崎真弥, 崎村建司, 狩野方伸: The endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol suppresses excitatory synaptic inputs around the inner and middle molecular layers of the dentate gyrus during seizures. 第 38 回日本神経科学会 2015/7/29 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

10. 奥野浩行, 遠藤俊裕, 金亮, 漆原圭一郎, 阿部学, 掛山正心, 崎村建司, 尾藤晴彦: Impaired behavioral flexibility and altered competitive dominance in Arc/Arg3.1-deficient mice. 第 38 回日本神経科学会 2015/7/29 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

11. 宮崎太輔, 山崎美和子, 崎村建司, 渡辺雅彦: Calcineurin B1 subunit expressed in Purkinje cell is essential for the formation of excitatory and inhibitory cerebellar neuronal network 第 38 回日本神経科学会 2015/7/28 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

12. 中務胞, 夏目里恵, 中本千尋, 崎村建司: ラット胚移植における三種混合麻酔の有用性 第 62 回日本実験動物学会総会 2015/5/29 京都テルサ (京都府京都市)

13. Abe M: Gene targeting and genome editing in C57BL/6 mouse strain for brain research. BRI International Symposium 2015 2015/3/5 新潟大学脳研究所 (新潟県新潟市)

14. Zhou L, Abe M, Yamazaki M, Natsume R, Sakimura K: Functional loss of Nna1 is responsible for Purkinje degeneration. 第 37 回日本分子生物学会大会 2014/11/27

パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

15. 中務胞、夏目里恵、中本千尋、崎村建司 :  
ラット ES 細胞から遺伝子改変動物作製の効  
率化: 桑実胚を用いたキメラ胚作出法. 第 37  
回日本分子生物学会大会 2014/11/26 パ  
シフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

16. Sugaya Y, Yamazaki M, Sakimura K, Kano  
M: The endocannabinoid 2- arachnidonoyl  
glycerol suppresses seizures by  
decreasing excitatory synaptic input  
around the inner molecular layer or the  
dentate gyrus. Neuroscience 2014  
2014/11/18 Washington DC, USA

17. Ageta-Ishihara N, Yamazaki M, Konno K,  
Nakayama H, Abe M, Miyakawa T, Hashimoto  
K, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M:  
CDC42EP4-septin complex in para synaptic  
domains of Bergmann glia facilitates  
cerebellar motor learning via  
GLAST-mediated glutamate clearance from  
the parallel fiber-Purkinje cell synapses.  
Neuroscience 2014 2014/11/17 Washington  
DC, USA

18. Nakamoto C, Watanabe I, Natsume R,  
Nakatsukasa E, Konno K, Abe M, Watanabe M,  
Sakimura K: The dynamics and function of  
two glutamate receptor delta subunits.  
Neuroscience 2014 2014/11/16 Washington  
DC, USA

19. Konno K, Matsuda K, Nakamoto C,  
Sakimura K, Watanabe M: Enriched  
expression of GluD1 in higher brain  
regions and its involvement in parallel  
fiber-interneuron synapse formation in  
the cerebellum. Neuroscience 2014  
2014/11/16 Washington DC, USA

20. 中本千尋、吉田豊、渡辺和泉、渡辺雅彦、  
木下専、山本格、崎村建司: Delta 型グルタ  
ミン酸受容体の細胞内局在と結合分子群.  
第 57 回日本神経化学学会大会 2014/9/30 奈  
良県文化会館 (奈良県奈良市)

21. Talukder A, Fuse T, Uchida K, Yamazaki  
M, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Itoi K:  
The effect of glucocorticoid on Venus  
expression in the paraventricular nucleus  
of the CRF-Venus knockin mouse. 第 37 回  
日本神経科学大会 2014/9/12 パシフィコ横  
浜 (神奈川県横浜市)

22. 金子涼輔、阿部 学、渡辺雅彦、崎村建  
司、柳川 右千夫、八木 健: クラスター型プ  
ロトカドヘリンの散発的発現: マウス脳にお  
ける Pcdh- 3 の発現解析. 第 37 回日本神経

科学大会 2014/9/11 パシフィコ横浜( 神奈川  
県横浜市)

23. Watanabe I, Akashi K, Abe M, Natsume  
R, Konno K, Watanabe M, Sakimura K: Kainate  
receptor Gluk2 and Gluk5 subunits are  
involved in locomotor activity. 9th FENS  
forum of Neuroscience 2014/7/8 イタリ  
ア・ミラノ

24. 中務胞、夏目里恵、中本千尋、崎村建司 :  
E S 細胞からの効率的な遺伝子改変ラットの  
作製: 凍結胚を用いたキメラ胚作出法. 第  
61 回実験動物学会 2014/5/16 札幌コンベ  
ンションセンター (北海道札幌市)

[ 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 ]

ホームページ等

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~cellular/>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

崎村 建司 ( Sakimura Kenji )

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号 : 40162325

### (2) 研究分担者

阿部 学 ( Abe Manabu )

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号 : 10334674

夏目 里恵 ( Natsume Rie )

新潟大学・脳研究所・技術職員

研究者番号 : 60467082

中務 胞 ( Nakatsukasa Ena )

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号 : 60641579

周 麗 ( Zhou Li )

新潟大学・脳研究所・特任助教

研究者番号 : 80568410

### (3) 連携研究者 なし