

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

神経組織特異的 *Scrapper* ノックアウトマウスの作出と
学習行動に関する解析

研究代表者 矢尾 育子 1)
研究分担者 笹岡 俊邦 2) 阿部 学 2) 崎村 建司 2) 高雄 啓三 3)

1) 関西学院大学 2) 新潟大学脳研究所 3) 富山大学

研究要旨

SCRAPPER は神経シナプスに局在し、神経伝達物質放出の制御にかかるユビキチン E3 リガーゼである。*Scrapper* 遺伝子ノックアウト (SCR-KO) マウスが生後致死であるため、成体での SCRAPPER 分子の機能を十分に解析できなかった。そこで部位特異的なコンディショナル KO (cKO) マウスを作製し、その詳細な機能解析を行うことを計画した。これまでの共同研究により、コンディショナルノックアウトマウス作製のための floxed 型のベクターを構築し、組換え ES 細胞株よりキメラマウスを作出している。その後、floxed 型マウスを樹立し、ドライバーマウスとの交配による神経組織特異的 SCR-cKO マウスの作製を試みている。当初計画したドライバーマウスは精巣での影響が懸念されたため、他の Cre 発現マウスを検討中である。また、発生初期に Cre 組換え酵素の mRNA をエレクトロポレーション法により導入し、SCR-KO マウスを作製し解析を行っている。

A. 研究目的

Scrapper 欠損マウス (SCR-KO マウス) は体が小さい上に寿命が短く、恐怖記憶形成の異常、脳の海綿状変性や神経細胞の萎縮といった老化現象が見られる。SCR-KO マウス脳において変動している分子の同定が神経変性疾患病態解明の 1 つの鍵になると考えられる。

SCR-KO マウスは、多くの個体が生後半年程度で死亡する。また、産仔数もメンデルの法則に従わず少ないことから、SCRAPPER が発生段階においても機能していることが予想される。本研究では、致死の表現型を回避し脳に限定した機能を解析することができる、神経細胞特異的なコンディショナル KO マウスを作製し、神経変性に関する解析をおこなう。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

floxed 型のベクターを構築し、このベクターを新潟大学崎村研究室で開発された RENKA 株 ES 細胞に導入し、相同組み換え体を選別する。これらの組換え ES 細胞株よりキメラマウスを作出し、生殖系列に ES 細胞が分化した個体より標的 floxed 型マウスを樹立する。さらに、神経細胞特異的な Cre 発現マウスを利用して、神経組織特異的なノックアウトマウスを作製して電気生理学実験等の機能解析や行動解析実験に供する。

動物実験計画は新潟大学、関西学院大学および富山大学の動物実験委員会および組換え DNA 安全実験委員会の承認を得たうえで、内規に準じて行う。実験時には適切に麻酔処理を行い、動物への苦痛を可能な限り除く。

C. 研究結果

現在までに、コンディショナルノックアウトマウス作製のための floxed 型のベクターを構築し、このベクターを新潟大学崎村研究室で開発された RENKA 株 ES 細胞に導入し、相同組み換え体を選別した。これらの組換え ES 細胞株よりキメラマウスを作出し、生殖系列に ES 細胞が分化した個体より標的 floxed 型マウスを樹立し、F1 世代のマウスを得ることができた。その後、FLP マウスとの交配を進め、スクリーニングのために導入されていたネオマイシン耐性遺伝子を除いたマウスを作製した。脳部位特異的な Cre 発現マウスを利用して、部位特異的なノックアウトマウスを作製して解析に供する計画であることから、神経細胞で特異的にノックアウト可能なドライバーマウスラインとして Emx1-Cre マウスを導入したこと、得られたヘテロ型コンディショナルノックアウトマウスは精巣に異常が見られ、予想外の表現型となる可能性があることが判明した。そのため、解析に適する別のドライバーマウスを検討、選択および交配、その後の解析を行う必要があり、適当な系統を検討中である。また、発生初期から Cre 組換え酵素を発現するドライバーマウスとの交配を行っていたが、富山大学との共同研究で Cre リコンビナーゼの mRNA を受精卵に導入し、SCR-KO マウスを作製、関西学院大学に導入することができた。以前に解析した C57BL/6J 系と 129/Sv 系混合バックグラウンド null ノックアウトマウスと同じ表現型か検討したところ、生後早い段階、ほとんどのホモ型ノックアウトマウスは離乳前後で死亡することが明らかとなり再現性が得られた。さらにマウスの表現型を解析するために、共同研究の継続を予定している。

D. 考察

過去に作製解析したノックアウトマウスはバックグラウンド系統が複数の雑種となっていたことから、今回得られたマウスを用いた解析はバックグラウンド系統の影響を消去した考察が可能となった。今後、解析に適するドライバーマウスを選択し、さらに交配を行い、ノックアウトマウスラインの樹立とその後の解析が必要であるため、脳研究所の助言を得ながら共同研究を推進、継続する。

E. 結論

SCR-cKO マウス作製のための floxed 型マウスを樹立している。今後さらに繁殖、ドライバーマウスとの交配により神経細胞特異的 SCR-cKO マウスを作製し、行動解析を含めた表現型解析を行う。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Kawabata R, Shimoyama S, Ueno S, Yao I, Arata A, Koga K.
TRPA1 as a O₂ sensor detects microenvironmental hypoxia in the mice anterior cingulate cortex.
Sci Rep. 2023 Feb 20;13(1):2960.
2. Onoda K, Kato M, Tsunematsu Y, Eto F, Sato M, Yoshioka Y, Yoshida T, Tamura K, Yao I, Dohra H, Watanabe K, Miyoshi N.
Biosynthetic Gene Expression and Tissue Distribution of Diosgenin in *Dioscorea japonica*.
J Agric Food Chem. 2023 Mar 15;71(10):4292–4297.
3. Kurihara M, Mano T, Eto F, Yao I, Sato K, Ohtomo G, Bannai T, Shibata S, Ishiura H, Ikemura M, Matsubara T, Morishima M, Saito Y, Murayama S, Toda T, Setou M, Iwata A.
Proteomic profile of nuclei containing p62-positive inclusions in a patient with neuronal intranuclear inclusion disease.
Neurobiol Dis. 2023 Feb;177:105989.
4. Yamada H, Xu L, Eto F, Takeichi R, Islam A, Mamun MA, Zhang C, Yao I, Sakamoto T, Aramaki S, Kikushima K, Sato T, Takahashi Y, Machida M, Kahyo T, Setou M.
Changes of Mass Spectra Patterns on a Brain Tissue Section Revealed by Deep Learning with Imaging Mass Spectrometry Data.
J Am Soc Mass Spectrom. 2022 Sep 7;33(9):1607–1614.

2. 学会発表

1. 川端遼、荒田晶子、矢尾育子、古賀浩平
Acute elevated platform triggers stress effects on escape threshold and changes in anterior cingulate cortex synaptic transmission (ポスター)
NEURO2022 (第 45 回日本神経科学大会・第 65 回日本神経化学会大会・第 32 回日本神経回路学会大会 合同開催)
2022/6/30-7/3 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市) ※ハイブリッド開催
2. 川端遼、藤田あゆみ、矢尾育子、古賀浩平
マウス高所ストレス下における前帯状回のシナプス可塑性
第 32 回神経行動薬理若手研究者の集い
2022/11/29 埼玉医科大学 (川越市)
3. 江戸谷歩、矢尾育子、鳥山道則
DHA が脳機能に与える影響の解析 (ポスター)
第 45 回日本分子生物学会年会
2022/11/30-12/2 幕張メッセ (千葉市)
※ハイブリッド開催
4. 中藤正信、豊永優月、矢尾育子、鳥山道則
神経回路網形成時における AAK1 の機能解析 (ポスター)
第 45 回日本分子生物学会年会
2022/11/30-12/2 幕張メッセ (千葉市)
※ハイブリッド開催
5. 濱本稜斗、矢尾育子、鳥山道則
神経細胞における不要和脂肪酸の老化抑制効果の解析 (ポスター)
第 45 回日本分子生物学会年会
2022/11/30-12/2 幕張メッセ (千葉市)
※ハイブリッド開催
6. 前川北斗、矢尾育子、鳥山道則
神経回路網形成時におけるクエルセチンの機能解析 (ポスター)
第 45 回日本分子生物学会年会
2022/11/30-12/2 幕張メッセ (千葉市)
※ハイブリッド開催
7. 山ノ井俊宏、鳥山真奈美、伊東広、矢尾育子、鳥山道則
RNA 結合能を有する新規 Asef2 スプライシングバリエントの同定と機能解析 (ポスター)
第 45 回日本分子生物学会年会
2022/11/30-12/2 幕張メッセ (千葉市)
※ハイブリッド開催
8. 飛嶋 郁充、鳥山道則、矢尾育子
神経シナプス超解像イメージングに向けた DNA-PAINT 条件の最適化 (ポスター)
日本生理学会第 100 回記念大会
2023/3/14-16 国立京都国際会館 (京都市) ※ハイブリッド開催
9. 中垣悠美、鈴木慎一郎、矢尾育子、鳥山道則
樹状突起スパイン形成を司る RNF39 のタンパク質間相互作用の解析 (ポスター)
日本生理学会第 100 回記念大会
2023/3/14-16 国立京都国際会館 (京都市) ※ハイブリッド開催
10. 古川彩芽、矢尾育子、鳥山道則
ノビレチンによる新たな神経機能制御機構の解明 (ポスター)
日本生理学会第 100 回記念大会
2023/3/14-16 国立京都国際会館 (京都市) ※ハイブリッド開催
11. 山ノ井俊宏、鳥山真奈美、伊東広、矢尾育子、鳥山道則
Identification and characterization of Asef2 splicing variant bound to RNA (ポスター)
日本生理学会第 100 回記念大会
2023/3/14-16 国立京都国際会館 (京都市) ※ハイブリッド開催
12. 矢尾育子
質量顕微鏡法による神経伝達物質の可視化 (シンポジウム : 質量顕微鏡法の広範な分野における応用)
日本顕微鏡学会第 78 回学術講演会
2022/5/11 ビッグパレットふくしま (郡山市) ※ハイブリッド開催

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
国内特許、国際特許各 1 件出願
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし