

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 *Scraper* 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わるユビキチン E3 リガーゼである。*Scraper* 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 発現マウスとの交配を行っている。

A. 研究目的

Scraper 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とともに、記憶・学習における *Scraper* 遺伝子の役割を行動解析により明らかにする。

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脳研究所で開発された 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脳研究所で開発された 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 マウスを導入したところ、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巢に異常が見られ、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、適当な系統を検討した。

また、並行して富山大学との共同研究で、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受精卵に導入し、null の SCR-KO マウスを作製した。その後関西学院大学にマウスを搬入し、繁殖させ解析を行っている。本研究で作製したマウスと別系統となる、以前に解析に用いた C57BL/6J 系と 129/Sv 系混合バックグラウンドの null ノックアウトマウスと同じ表現型が検討したところ、生後早い段階で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という再現性が得られている。僅かではあるが、ホモ型ノックアウトマウスも産出されたため、生化学解析に用いた。また、ヘテロ型個体を用いた表現型解析を進めている。

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ている。今後、神経特異的に Cre を発現するドライバーマウスとの交配により、ノック

アウトマウスラインの樹立を継続する予定である。さらに行動解析が必要であるため、脳研究所の助言を得ながら新たな計画として共同研究をすすめる。

E. 結論

SCR-cKO マウス作製のための floxed 型マウスを樹立し繁殖中である。今後、新たに検討する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, Yamamoto S, Kamimura N, Yao I, Yoshikawa K, Koga K. Cuprizone-induced demyelination provokes abnormal intrinsic properties and excitatory synaptic transmission in the male mouse anterior cingulate cortex. *Neuropharmacology*. 2025 Jun 15;271:110403.
2. Xu L, Zhai Q, Islam A, Sakamoto T, Zhang C, Aramaki S, Sato T, Yao I, Kahyo T, Setou M. Interpolation of Imaging Mass Spectrometry Data by a Window-Based Adversarial Autoencoder Method. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2025 Jan 1;36(1):127-134.
3. Kawabata R, Fujita A, Oke Y, Yao I, Koga K. The elevated open platform stress suppresses excitatory synaptic transmission in the layer V anterior cingulate cortex. *Neuroscience*. 2025 Jan 9;564:243-259.

2. 学会発表

1. 木津亮馬, 山本梓司, 川端遼, 古賀浩平, 吉川圭介, 矢尾育子
質量分析イメージングを用いたクプリゾン誘発性脱髄による脳内状況の変動解析（ポスター）

- 第 47 回日本分子生物学会年会
2024/11/27-29 福岡国際会議場 (博多市)
2. 吉田朋花, 鳥山道則, 矢尾育子
低分子量 GTPase Rac1 の RNA 結合能の解析 (ポスター)
第 47 回日本分子生物学会年会
2024/11/27-29 福岡国際会議場 (博多市)
 3. 田中菜月, 濱本遼斗, 矢尾育子, 鳥山道則
DHA による神経細胞老化抑制: SARM1 を介した新規メカニズムの解明
第 47 回日本分子生物学会年会
2024/11/27-29 福岡国際会議場 (博多市)
 4. 勝井優羽音, 矢尾育子, 鳥山道則
一次繊毛局在分子 Arl13b の RNA 結合能の解析 (ポスター)
第 47 回日本分子生物学会年会
2024/11/27-29 福岡国際会議場 (博多市)
 5. 浜田拓実, 田中菜月, 矢尾育子, 鳥山道則
バーチャルスクリーニングによる新規 SARM1 阻害化合物の探索による神経老化予防薬の開発 (ポスター)
第 47 回日本分子生物学会年会
2024/11/27-29 福岡国際会議場 (博多市)
 6. 酒井那奈, 田中菜月, 濱本遼斗, 矢尾育子, 鳥山道則
新規 DHA 結合タンパク質による神経細胞の細胞老化抑制機構の解析 (ポスター)
第 47 回日本分子生物学会年会
2024/11/27-29 福岡国際会議場 (博多市)
 7. 木津亮馬, 小林吉晴, 鳥山道則, 矢尾育子
質量分析イメージングを用いた Scrapper 遺伝子欠損マウスにおける脳内アセチルコリン量の変動解析
第 49 回日本医用マスメクトル学会年会 2024/9/13-14 島津製作所本社 (京都市)
 8. 川端遼, 山本梓司, 木津亮馬, 吉川圭介, 古賀浩平, 矢尾育子
クブリゾン誘発性脱髄による前帯状回興奮性シナプス伝達の抑制
第 49 回日本医用マスメクトル学会年会 2024/9/13-14 島津製作所本社 (京都市)
 9. Ikuko Yao
Application of MALDI imaging mass spectrometry for neurobiology (シンポジウム)
The 3rd International Joint Symposium of JSBMS and MSACL
2024/9/13 島津製作所本社 (京都市)
 10. 川端遼, 藤田あゆみ, 古賀浩平, 矢尾育子
高架式プラットフォーム試験誘発性ストレスが前帯状回シナプス伝達に及ぼす影響 (ポスター)
Neuro2024 (第 47 回日本神経科学大会・第 67 回日本神経化学会大会・第 46 回日本生物学的精神医学会年会・第 8 回アジアオセアニア神経科学連合コンgres) 2024/7/24-27 福岡国際会議場 (博多市)
 11. 木津亮馬, 小林吉晴, 鳥山道則, 矢尾育子
質量分析イメージングを用いた Scrapper 遺伝子欠損マウス脳アセチルコリンの検出
第 72 回質量分析総合討論会 2024 2024/6/10-12 つくば国際会議場 エポカルつくば (つくば市)
- 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 1 件出願
国際特許 1 件出願
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし