

平成 17 年度 研究リソース開発 成果報告書

平成 18 年 2 月 21 日提出

ふりがな	こばやし かずと	所属・職	福島県立医科大学・教授
開発代表者名	小林 和人		
開発課題名	行動制御を媒介する神経回路研究のためのトランスジェニックラットの開発		
<p>開発経過及び成果(開発目標に対する成果を計画書に記載した内容に対応させて記載すること)</p> <p>本研究では、運動の学習や発現における線条体出力経路の役割を解析するために、ドーパミン D1 受容体 (Drd1) およびドーパミン D2 受容体 (Drd2) 遺伝子の制御下にヒトインターロイキン-2 受容体α サブユニット (IL-2Rα) を発現するトランスジェニックラットを作製し、イムノキシン細胞標的法を利用することによって、2種類の線条体出力ニューロンを選択的に除去する実験系を開発する。ならびに、運動の学習や発現における線条体アセチルコリンインターニューロンの役割を明らかにするために、コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 遺伝子の制御下に IL-2Rα を発現するトランスジェニックラットの作成も行う。平成17年度は、これらのトランスジェニックラットを作成するための導入遺伝子の構築を行った。以下にその詳細を報告する。</p> <p>BAC ライブラリーデータベース検索により、複数のラット Drd1、Drd2、ChAT 遺伝子座を含む BAC クローンを同定した。これらの BAC クローンのうち、CH230-280F20 は Drd1 遺伝子座の 50 kb の 5' 側上流領域、全てのコード領域、および 150 kb の 3' 側下流領域のゲノム配列を、そして CH230-11B15 は Drd2 遺伝子座の 160 kb の 5' 側上流領域、全てのコード領域、および 30 kb の 3' 側下流領域のゲノム配列を含んだ。また、CH230-520K7 は ChAT 遺伝子座の 140 kb の 5' 側上流領域、隣接する vAChT 遺伝子も含む全てのコード領域、および 45kb の 3' 側下流領域のゲノム配列を含んだ。</p> <p>導入遺伝子を作成するために、Drd1、Drd2、ChAT 遺伝子座の翻訳開始コドンに隣接する約 40 塩基の相同配列、ヒト IL-2Rα と YFP の融合遺伝子 (IL-2Rα/YFP)、組換え BAC クローンの選択に利用するポジティブ・ネガティブマーカートをプラスミドベクターに挿入し、3 種類の遺伝子のトランスファーカセットを構築した。大腸菌内での能動型相同組み換え反応である Red/ET Recombination Technology を利用して、Drd1、Drd2、ChAT 遺伝子組換え BAC 発現コンストラクトの構築を行った。3 種類の遺伝子座を含む BAC クローンの翻訳開始コドンに、能動型相同組み換え反応を用いてインフレームになるように IL-2Rα/YFP トランスファーカセットを正確に挿入した。シーケンス解析により、組換え BAC 発現コンストラクトの DNA 配列を確認した。</p> <p>ラットの前核期胚へのマイクロインジェクション、あるいはラットの未受精卵への精子ベクター法によるトランスジェニックラット作製に利用するための発現コンストラクトの精製を行った。環状の組換え BAC 発現コンストラクトをシリカゲルカラムにより大腸菌体から抽出し、制限酵素 NotI、あるいは PI-SceI でベクター配列と発現コンストラクトを切断した。パルスフィールド電気泳動により、直鎖化された 200 kb 以上の導入遺伝子を分離し、電気溶出法でアガロースゲルから抽出した。</p>			

開発成果を踏まえた今後の展開

平成18年度は、第一に、トランスジェニックラットの作製に必要な Long Evans 系統ラットの繁殖コロニーを構築する。そのために、Long Evans 系統ラットの過剰排卵処置による卵の回収効率を検討する。4週令、または5週令の若齢 Long Evans 系統ラット、雌個体に PMSG 150、あるいは 300 IU/kg を、そして hCG 300 IU/kg をそれぞれ投与して、同系統の雄個体と交配を行い、回収される受精卵の個数を計測する。過剰排卵処置による卵の回収効率のデータをもとに、トランスジェニックラットの作製に必要な規模の繁殖コロニーを構築する。

第二に、マイクロインジェクション法により導入遺伝子あたり約 400 個の受精卵への DNA 注入を行い、受精卵を仮親雌ラットに移植する。ラットの尾より DNA を抽出し、サザンブロット法を用いてトランスジェニックラットファウンダー個体を同定する。一方、精子ベクター法を用いてトランスジェニックラットの作製を行う。この方法では、精子に bicationic lipid を用いて導入遺伝子を結合させ、卵子細胞質内への顕微注入により体外受精を行う。精子ベクター法では、導入遺伝子あたり 200 個の卵子へ DNA 導入を行い、トランスジェニックファウンダー個体を作成する。ファウンダー個体を同系統の野生型ラットと交配させて、後代のラット個体を得る。サザン解析により、生殖系列細胞に安定にトランスジーンが伝達された系統を樹立する。

次年度以降、当初の計画に従って研究を進める。平成 19 年度は、系統選択とイムノトキシン処理を行う。

導入遺伝子の発現を検出するために、各系統から脳切片を作製し、抗-IL-2R α 抗体を用いた免疫組織化学あるいは YFP 蛍光の観察を行う。また、線条体投射ニューロンのマーカーであるサブスタンス P あるいはエンケファリンと導入遺伝子の共存を解析する。これらの解析を通して、細胞タイプに特異的な遺伝子発現を示すラット系統を選択する。ラット系統の背側線条体にイムノトキシンを注入し、標的ニューロンの選択的な除去を誘導する。イムノトキシンの注入部位および量について適当な条件を検討する。

平成 20 年度は、行動および生理学的な解析を行い、標的ニューロンの除去による表現型について調べる。行動については、運動量、オペラント条件付け課題について解析する。生理学的変化については、ユニット記録法を用いて、選択的ニューロン除去による大脳基底核回路を構成する主要な神経核の電気生理学的な変化を解析する。また、スライス電気生理学の手法を用いて、線条体回路の動態について解析する。