

平成 18 年度 研究リソース開発 成果報告書

平成 19 年 2 月 13 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		

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）

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-2R α ）を発現するトランスジェニックラットを作製し、イムノト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-2R α 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 18 年度は、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とともに、上記のトランスジェニックラットを作成し、系統化した。以下にその詳細を報告する。

第一に、Long Evans 系統ラットの繁殖コロニーを構築するために、排卵誘発に適した条件の検討を行った。若齢 Long-Evans 系統ラット、雌個体に PMSG 150、300 IU/kg、および hCG 300 IU/kg をそれぞれ投与して、同系統の雄個体と交配の後に回収される受精卵の個数を計測した。その結果、PMSG 150 IU/kg 投与により平均 2.5 個の受精卵を採取できることが明らかになった。この実験結果により、トランスジェニックラット作出に供する受精卵を確保するための、優れた過剰排卵誘発プロトコルを確立することができた。

第二に、組換え BAC 発現コンストラクト（Drd1-IL-2R α /YFP, Drd2-IL-2R α /YFP, ChAT-IL-2R α /YFP）を利用して、ファウンダーの作出を行った。それぞれ 400 個以上、合計約 1,400 個のラット前核期胚に発現コンストラクトのマイクロインジェクションを行い、合計 221 頭を離乳にいたるまで育成した。尾より抽出した DNA のサザン解析により、1～30 コピーのコンストラクトがファウンダーに導入されたことを確認した。以上の実験により、合計 26 頭（Drd1-IL-2R α /YFP 5 頭、Drd2-IL-2R α /YFP 7 頭、ChAT-IL-2R α /YFP 14 頭）のトランスジェニックラットファウンダーを同定することができた。交配適期のファウンダーを野生型同系統ラットと交配させ、合計 480 頭の後代ラットを得た。DNA 解析により、合計 165 頭（Drd1-IL-2R α /YFP 45 頭、Drd2-IL-2R α /YFP 43 頭、ChAT-IL-2R α /YFP 77 頭）の G1 個体（ヘミ）を同定した。26 頭のファウンダーのうち、G1 個体にトランスジーンを伝達した個体は合計 23 個体であり、このうち 2 頭は複数のトランスジーン遺伝子座を持つ個体であった。これらの 2.3 系統のうち、一部の系統については、免疫染色法によって線条体における導入遺伝子の発現を確認した。今後、他の系統についても導入遺伝子の発現解析を継続し、さらにイムノトキシンの感受性を調べることによって、行動生理実験に使用する系統の選択を行う。

開発成果を踏まえた今後の展開

平成 19 年度は、複数のトランスジェニックラット系統について導入遺伝子の発現とイムノトキシンの感受性を解析する。ラット系統における導入遺伝子の発現を検出するために、各系統から脳切片（線条体）を作製し、YFP 蛍光の観察あるいは抗-GFP 抗体を用いた免疫染色を行う。ChAT-IL-2R・/YFPラットについては、アセチルコリンニューロンのマーカーである ChAT との共存を二重染色により確認する。これらの解析により、導入遺伝子を発現するトランスジェニックラット系統の絞込みを行う。これらのラット系統について、背側線条体に組換え体イムノトキシンの anti-Tac (Fv)-PE38 を脳定位固定装置により注入し、標的ニューロンの選択的な除去を試みる。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。選択的な除去の確認は、種々の線条体ニューロンのマーカーを用いた免疫組織化学により行う。この方法を用いて、線条体ニューロンタイプに特異的な細胞除去を誘導できるトランスジェニックラット系統を選択する。これらの系統を集中的に繁殖し、平成 20 年度の解析に用いるコロニーを作製する。

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。