

20000 926 ~ 0936

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

# 目 次

## 課題番号

11011	脳梗塞動物モデルの開発と創薬研究への応用	柳本 広二	……	1
11037	免疫・脳神経系のゲノム恒常性維持に係る遺伝子発現制御機構の解明	葛西 正孝	……	7
11106	ヒト組織構築モデル動物の作製と応用に関する研究	藤本純一郎	……	12
11168	疾患モデルラットの調査とラットゲノムの基盤研究によるヒト疾患遺伝子の総合的探索研究	芹川 忠夫	……	19
11178	神経・筋疾患モデル動物の病態解析及び開発のための基礎研究	菊池 建機	……	25
11217	長寿命新規蛍光標識剤の開発および応用	嶋 秀明	……	30
12004	薬物及び生体分子の高感度高性能分析・解析技術の開発に関する研究	今井 一洋	……	38
12129	ゲノム情報に基づく骨疾患治療医薬品の開発に関する研究	瀬原 淳子	……	45
12259	白血球機能の新しい制御手法の開発に関する研究	鈴木 和博	……	50
12263	チャネルの開口を視る技術の開発研究	川西 徹	……	56
12271	正常ヒト上皮組織に由来する初代培養細胞の増殖制御機構の解析とその研究資源化に関する研究	林 真	……	66

## 疾患モデルラットの調査とラットゲノムの基盤研究によるヒト疾患遺伝子の総合的探索研究

所 属 京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設  
研究者 芹川 忠夫

### 分担研究者

- (1) 国立がんセンター研究所発がん研究部 庫本高志
- (2) 田辺製薬株式会社 先端医学研究部 近藤 靖

### 要 旨

マウスとラット間の比較ゲノム地図を拡充した。また、ポジショナルクローニングにより、zitter 遺伝子がアトラクチン遺伝子の変異体であること、この遺伝子がミエリン形成に重要であることを発見した。さらに、てんかんラット NER と WOLFラットの遺伝解析と原因遺伝子のマッピングを行った。

### 1. 研究目的

個体レベルの遺伝子機能解析は、今後ゲノムサイエンスの情報を基にして、活発に展開されることとなる。それゆえ、選抜育種された疾患モデル動物は、多因子疾患における複数の遺伝子の相互作用を知るための個体レベルのモデル系として、貴重である。実験用ラット(*Rattus norvegicus*)は、医学生物学の基礎研究から医薬品の薬効試験あるいは安全性試験まで、広く活用されている。そして、選抜育種された疾患モデルラット、多様なミュータント系統、発癌感受性、免疫応答性、行動特性、環境に対する生理学的応答の異なるラット等が存在する。本研究の目的は、我が国における疾患モデルラットに関する情報収集とその公開を進めること、疾患モデルラットの原因遺伝子のポジショナルクローニングをシステム化すること、そして、具体的に特定の疾患モデルラットにおける原因遺伝子をポジショナルクローニングで同定することである。

### 2. 研究方法

- 1) 本研究プロジェクトの一つとして、疾患モデルラットのホームページ「日本で維持されている自然発症疾患モデルラットの一覧」<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp> を開設しているので、疾患モデルラットの開発者あるいは興味のある研究者の協力を得て、個々のラット系統の紹介テキストおよび文献を更新した。
- 2) Radiation Hybrid (RH)マップの遺伝子位置情報を取り込んだマウス・ラット・ヒト間の比較遺伝子地図を作成し、マウスの遺伝的連鎖地図と比較することによりラット遺伝子地図における欠落箇所を調査した。次いで、欠落箇所にあるマウス遺伝子のラットオーソログをシーケンスホモロジーにより検索した。それにより、これまで位置情報の不明であったラット遺伝子を体細胞交雑クローンパネルと放射線切断クローンパネルを使用して、新たにマッピングした。
- 3) 振戦、中枢神経系における空胞変性、ミエリン低形成、ミエリンの形成異常等を呈するミュータント zitterラットについて、その原因遺伝子をラット第3染色体の高精度地図上にマッピングした。次いで、コンティグを構築するとともに、マウスとヒトとの比較ゲノム地図を作成した。この領域にあるヒトの遺伝子及び遺伝子転写単位をラットのコンティグ上にマッピングし、それぞれについて原因遺伝子であるか否かについて検討した。
- 4) ヒトの特発性全般てんかんのモデルとされる NERラットにおける強直間代けいれんの遺伝性を確認した。さらに、原因遺伝子の同定を最終目標にして、F344/Nとの戻し交雑仔を用いて発症に関わる遺伝子群のマッピングを行った。放り上げ刺激によって、発作発症週齢を早めることができるので、この刺激下と非刺激下における自発性の強直間代けいれんの遺伝性を解析し、全ゲノムに分散したマ

マイクロサテライトマーカーとの連鎖解析によって、発症に関与する遺伝子をマッピングした。

5) 中枢神経系の空胞と振戦を呈する WOLF ラットの遺伝性の解析と原因遺伝子のマッピングを行った。すなわち、ACI/N との F2 世代仔を作出して、全ゲノムに分散したマイクロサテライトマーカーとミュータント形質の連鎖解析を行った。

### 3. 研究成果

#### 1) 疾患モデルラットのホームページの更新

「我が国で維持されている疾患モデルラットの一覧」の情報を更新した。

#### 2) ラット・マウス・ヒト比較ゲノム地図の拡充

ラット遺伝子地図をマウスの連鎖地図と比較することにより、マウス第 1、4、8、13、14、15、16、17 染色体に相当するラットゲノム領域の情報が欠けていることが判明した。そこで、BLAST サーチを実施することにより、これらの欠落部位に位置するマウス遺伝子のラットオーソログを見出した。次いで、特異的なプライマーを用いて、体細胞交雑クローンパネルと RH クローンパネルによる遺伝子マッピングを行った。その結果、上記の欠落部位における遺伝子位置情報が得られ、マウス・ラット間の比較遺伝子地図は、ほぼ完成の域に達した。

#### 3) ポジショナルクローニングによる zitter 遺伝子の同定

zitter (zi) 遺伝子の存在する可能性がある領域を 0.1cM 以内の範囲に狭め、この全領域を包含するコンティグを作製した。次いで、この領域と相同なヒト第 20 染色体上の遺伝子、EST を抽出して、上記コンティグ上にマッピングした (Fig. 1, Fig. 2)。さらに、ミュータントと正常対照との間で、個々の遺伝子発現の変化や塩基配列の変異の有無を検討した。その結果、Attractin (Atrn) 遺伝子の発現が zi/zi ラットにおいて著しく減少していることが判明した。これは、第 12 イントロンのスプライシング受容部位に存在することが見いだされた 8 塩基対の欠失によると推測された (Fig. 3)。Atrn 遺伝子に変異をもつマホガニーマウスと同様に、ACI ラットとの交配により zi/zi ラットにアグーチ遺伝子を導入したところ、野生色の毛色を黒化する効果が認められた。トランスジェニックラットの作製による回復試験を行ったところ、CAG プロモーターとメタロチオネインプロモーターのいずれのラインでも、正常な膜型アトラクチンのトランスジーンにより、ミエリン形成不全、空胞変性、振戦、弛緩性麻痺のすべてが回復した。さらに、マホガニーマウスの行動と病理学的解析の結果、zitter ラット同様に振戦と中枢神経系の形態学的変化が観察された。以上の結果、zi 遺伝子は、Atrn 遺伝子の変異であること、ラットの Atrn 遺伝子は、膜型と分泌型アトラクチンをコードしており (Fig. 4)、そのうち膜型アトラクチンが中枢神経系のミエリン形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

#### 4) 遺伝性てんかんモデルラット NER の遺伝解析

このラットの強直間代けいれんについて、放り上げ刺激と非放り上げ刺激の条件下で遺伝解析を行った。その結果、刺激群の QTL 解析では、第 1 染色体 D1Rat215 と D1Rat132 との間で Lod score 3.49、第 3 染色体の D3M2Mit382 において Lod score 2.75 という値が得られた。さらに非刺激群の解析では D1Rat215 において Lod score 4.13 という値が得られた。この領域を強直間代けいれんの自然発症に関与する遺伝子座 Ner1 として命名した。第 3 染色体の D3M2Mit382 の領域は、刺激群のみでけいれん発症との連鎖を示したため、放り上げ刺激と関連した遺伝子座 Ner2 として命名した。

#### 5) 中枢神経系の空胞形成と振戦を呈する WOLF ラットの遺伝解析

WOLF の中枢神経系の空胞形成は、単一の常染色体劣性遺伝子によって支配されていることが示唆された。一方、振戦に関しては単純な遺伝様式ではないが、振戦発症個体は全て空胞形成を伴っていることが判った。遺伝多型マーカーとの連鎖解析の結果、空胞形成に係る遺伝子 (wlf と命名) は、第 8 染色体のマーカー D8Got134 の近くにマッピングされた。この部位は、比較ゲノム地図の構築研究から、マウス第 9 染色体とヒト第 6 染色体 q 腕にあたることを示した。

### 4. 考察

今年度は、自然発症てんかんモデルラット (Spontaneously Epileptic Rat, SER) というダブルミュータント (tm/tm, zi/zi) の原因遺伝子の一つでもある zi 遺伝子を同定することに成功した。この研究では、交配実験データをもとにして得られた高密度の連鎖地図を構築することに続いて、突然変異座位を完全に包含するコンティグの作製して、原因遺伝子の同定に迫った。最終的な候補遺伝子の探索は、その領域に相同なヒトゲノムにおいてリストされた遺伝子あるいは転写単位のラットオーソログを解

析するという手段をとった。ヒトゲノムのドラフトシーケンスが公開されている現在、本研究により確立された手法は、単一突然変異のポジショナルクローニングの標準的手法として推奨できる。突然変異ラット、疾患モデルラットの原因遺伝子同定の第一歩として、他に、特発性全般てんかんのモデルであるNERにおけるてんかん形質の遺伝的解析から原因遺伝子のマッピングを行い、また、中枢神経系のミュータントであるWOLFラットについても同様に遺伝学的解析とマッピング研究を進め、ポジショナルクローニングへの道を開いた。今後、大まかなマッピングの段階で、原因遺伝子の同定に成功させる工夫が必要とされよう。そのため、ラット・マウス・ヒト間の比較ゲノム地図の整備は、この分野の研究において重要な研究課題であり、作成される比較遺伝子地図の有用性は極めて高い。本研究においては、これまで欠落していた領域に焦点を当てて、比較遺伝子地図の拡充を進めてきた。マウスの遺伝子連鎖地図と対応させたところ、そのほぼすべての領域において相同なラットゲノム領域が特定され得ることが明らかになった。

Zitter 遺伝子の原因遺伝子として見出されたアトラクチン遺伝子については、これまで認識されていない機能の発見となった。すなわち、ヒトの分泌型アトラクチンは、活性型T細胞から分泌され、単球のクラスタリングを調節する糖たんぱく質として同定された。また、マウスでは、膜型アトラクチンのみが存在し、その loss of function 変異により、アグーチ遺伝子のサブレッサーとして機能することが知られていた。アトラクチン遺伝子にはCUBドメイン、EGFドメイン、C型レクチンドメインが存在することから、膜型アトラクチンは正常なミエリン形成に必須のアクソンとミエリンの相互認識・シグナル伝達・接着に関与していると推察される。

## 5. 結論

疾患モデルラットのホームページ「日本で維持されている疾患モデルラットの一覧」の更新、ラットゲノムマップの拡充、及び疾患モデルラットの原因遺伝子のマッピングから同定に向けたポジショナルクローニング研究を実施した。てんかんモデルラットNERの原因遺伝子Ner1（自発性の強直間代けいれんの発症に関与する遺伝子）とNer2（放り上げ刺激によって発作の発現時期を早めることに関与する遺伝子）のラット第1染色体と第3染色体へのマッピング、中枢神経系の新たなミュータントWOLFの空胞形成の原因遺伝子wlfが第8染色体に存在することを明らかにした。Zitterラットの原因遺伝子は、Attractin 遺伝子の突然変異によることが証明された。そして、膜型アトラクチンが中枢神経系のミエリン形成に重要な役割をしていることを発見した。

## 6. 研究発表

1. Yokoyama, M., Amano, S., Tsuji, A., Sasahara, M., Serikawa, T., Ihara, N., Matsuda, M., Hazama, F. and Handa, J.: Genetic analysis of cataract in Ihara epileptic rat. *Mamm Genome*, 12(3):207-211, 2001
2. Kuramoto, T., Kitada, K., Inui, T., Sasaki, Y., Ito, K., Hase, T., Kawaguchi, S., Ogawa, Y., Nakao, K., Barsh, G. S., Nagao, M., Ushijima, T. and Serikawa, T.: Attractin/Mahogany/Zitter plays a critical role in myelination of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (2): 559-564, 2001
3. Sasa, M., Zhu, A-H., Amano, T., Ishihara, K., Kohno, S., Ying, J-Q. and Serikawa, T.: Effects of clobazam on epileptic seizures in spontaneously epileptic rats (SER). *Jpn Pharmacol Ther*, 28 (4): 259-265, 2000
4. Voigt, B., Kitada, K., Kloting, I. and Serikawa, T.: Genetic comparison between laboratory rats and Japanese and German wild rats. *Mamm Genome*, 11 (9); 789-790, 2000
5. Maihara, T., Noda, A., Yamazoe, H., Voigt, B., Kitada, K. and Serikawa, T.: Chromosomal mapping of genes for epilepsy in NER: a rat strain with tonic-clonic seizures. *Epilepsia* 41 (8): 789-790, 2000
6. Kitada, K., Guenet, J-L. and Serikawa, T.: Determination of the mouse homologous region for the rat dmy locus. *J Exp Anim Sci*, 41: 40-43, 2000
7. Kitada, K., Voigt, B., Kondo, Y. and Serikawa, T.: An integrated rat genome map based on genetic and cytogenetic data. *Exp Anim*, 49: 119-126, 2000
8. Akimitsu, T., Kurisu, K., Hanaya, R., Iida, K., Kiura, Y., Arita, K., Matsubayashi, H., Ishihara, K., Kitada, K., Serikawa, T. and Sasa, M.: Epileptic seizures induced by N-acetyl-L-aspartate (NAA) in rats: in vivo and in vitro studies. *Brain Res*, 861: 143-150, 2000
9. Kitada, K., Akimitsu, T., Shigematsu, Y., Kondo, A., Maihara, T., Yokoi, N., Kuramoto, T., Sasa, M. and Serikawa, T.: Accumulation of N-acetyl-L-aspartate in the brain of the tremor rat, a mutant exhibiting

- absence-like seizure and spongiform degeneration in the central nervous system. *J. Neurochem*, 74: 2512-2519, 2000
10. Yokoi, N., Shimizu, S., Ishibashi, K., Kitada, K., Iwama H., Namae, M., Sugawara, M., Serikawa, T. and Komeda, K.: Genetic mapping of the rat mutation creeping and evaluation of its positional candidate gene *reelin*. *Mamm Genome* 11: 111-114, 2000
  11. Mashimo T., Nabika, T., Kitada, K., Serikawa, T., Matsumoto, C., Ohno, Y., Saruta, T., Ikeda, K., Nara, Y., Matsuda, J. and Yamori, Y.: Mapping of four simple sequence repeat (SSR) markers on rat chromosome 4. *Hypertens Res*, 23 (1): 47-50, 2000



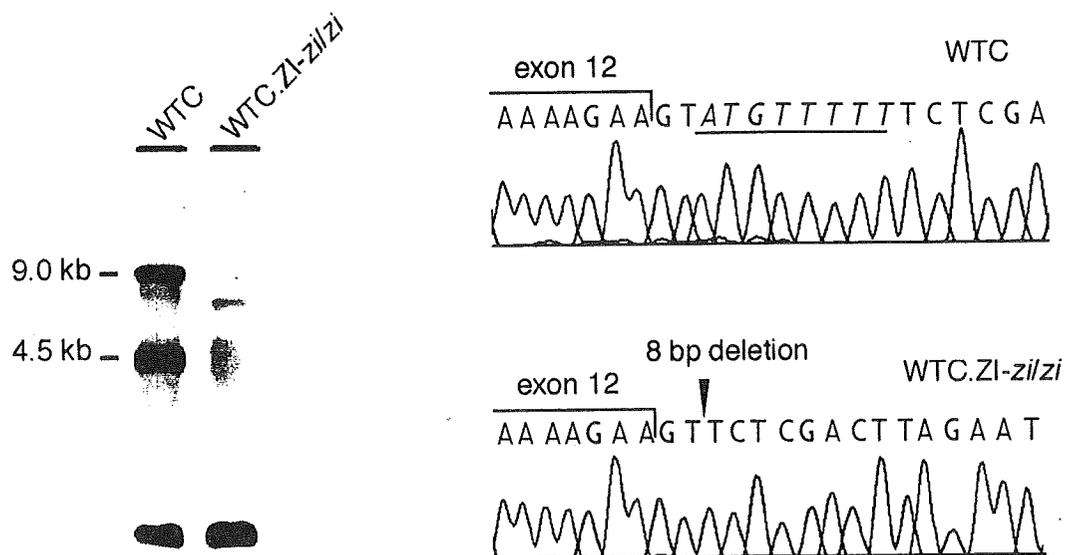


Fig. 3. Northern blot analysis of *Atrn* in the brains of WTC and WTC.ZI-zi/si rats. Marked reduction of *Atrn* expression was observed in zi/zi rats. Hybridization signals of beta-actin on the same blot are shown below. Sequencing analysis of the splice donor site of the *Atrn* intron 12 in WTC (upper) and WTC.ZI-zi/zi (lower). An 8-bp deletion was identified in zi/zi rats (underlined in the upper and shown with an arrowhead in the lower) and was expected to result in an abnormal splicing.

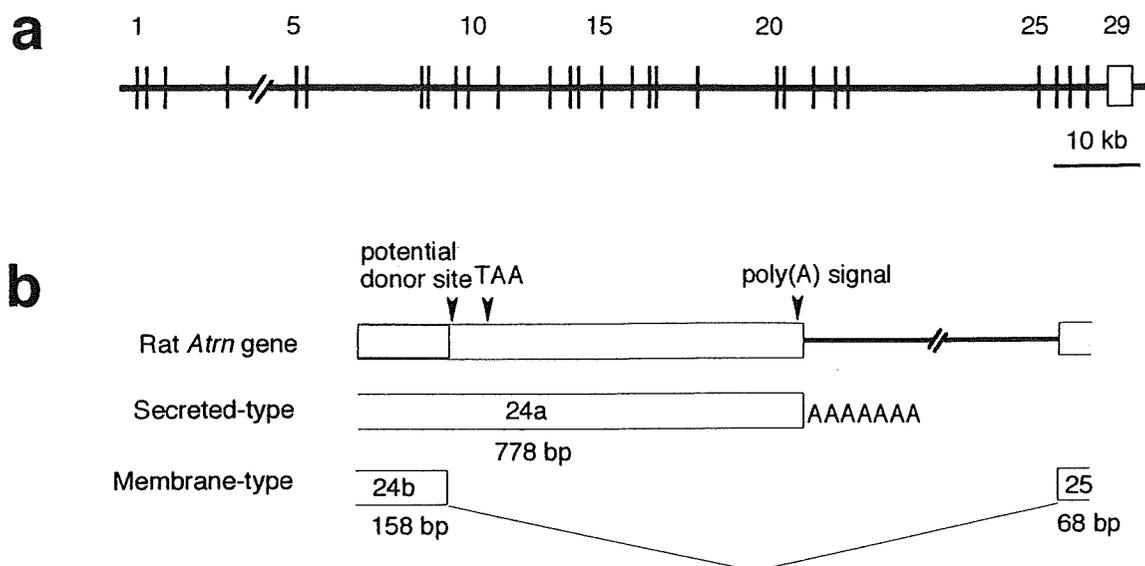


Fig. 4. Rat *Atrn* gene and its transcripts. (a) Exon-intron organization of the rat *Atrn* gene. The gene comprises at least 29 exons and 28 introns, which are represented as boxes and lines. The length of intron 4 could not be determined. (b) Alternative splicing at exon 24 of the rat *Atrn* gene. Genome organization around the intron 24 (top). The secreted-type *Atrn* transcript utilized the stop codon (TAA) and poly(A) addition signal located within the intron 24 (middle). The membrane-type *Atrn* transcript was spliced at the potential donor site located at 15-bp upstream from the stop codon of the secreted-type *Atrn* (bottom).

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社

