

No.	22-1012
研究課題名	新規ノックインラット「Ratbow」の樹立と応用
研究代表者	隈元 拓馬（公益財団法人 東京都医学総合研究所・主席研究員）
研究組織	受入教員 真下 知士（東京大学医科学研究所・教授）
	分担者 真下知士（先進動物ゲノム研究分野・教授）
	分担者 石田紗恵子（先進動物ゲノム研究分野・助教）
	分担者 服部晃佑（先進動物ゲノム研究分野・技術職員）

申請者（研究代表者）

隈元 拓馬

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業
共同研究報告書（年次終了・研究完了）【国内】

共同研究報告（研究完了）

ラットは行動実験や、高解像度イメージングに適していることから、神経科学や発生生物学分野において、特に脳機能を解明する上で大変有用なモデルとなる。しかしながら、マウスに比べ遺伝子改変ラットの整備は進んでいない。そこで本研究計画では、2021年度から細胞系譜をマルチカラーで標識するレポーターツール「Brainbow」を用いて、そのノックインラット系統である「Ratbow」の樹立を目指した。マウスにおける Brainbow は、神経細胞をクローン（同じ神経幹細胞から生まれる娘細胞群）単位で異なる色で標識することができるため、細胞の産生機構や、コネクトーム解析に広く応用されている。ラット脳はマウス脳よりも大きいため、Brainbow ストラテジーを用いた場合、より高解像度な細胞クローン解析、コネクトーム解析を可能にするポテンシャルがある。

(1年目→)そこで、受入研究室の開発した Combi-CRISPR 法を利用して、R26 locus への Brainbow カセットのノックイン (KI) ラット (Ratbow) の作製を始めた。Brainbow カセットは、申請者の前留学先が Brainbow の開発や展開を行なっている研究室であったので、留学先で使用していた最新型の Brainbow に、さらに機能解析を可能にする複数の配列を挿入することで、独自のカセットを作製した。これを利用し、R26 への挿入を進めた。(2年目→) Ratbow の産子が確認されると、genotyping や発現解析を進めた。Ratbow はレポーターラインであるため、それに掛け合わせるため、ドライバーの Cre ラインの樹立も並行して開始した。その結果、Thy1 プロモーター（神経細胞特異的）と EF1 プロモーター（ユビキタス）を使った2つの Cre ラインを樹立できた。Cre ラインを樹立後、既存のレポーターライン (Rosa26-CAG-EGFP-mCherry) で確認後、前年度作製した Ratbow と交配を行った。そして生まれた個体を4週齢まで成長させ、発現解析を行った。その結果、海馬において多重標識された神経細胞が確認できた。発現パターンから、ドライバーの Cre ラインは想定通り作製できたと言える。ただ Ratbow の方が、海馬以外の大脳皮質等の部位における蛍光発現量が想定よりも低く、改善の余地があると考えた。そこで3年目では、従来の Thy1 及び EF1 プロモーターを使用した Ratbow ではなく、より高発現が期待できる CAG-Ratbow の樹立を始めた。(3年目→) これまでの受入研究室の研究により、Rosa26 に CAG プロモーターを使ったノックインを行う場合、挿入配列の過剰発現によって致死が生じることがわかっている。そのため、今回は Rosa26 locus に CAG プロモーターを逆位で挿入することを試みた。複数回挑戦した結果、胎生致死や、食殺等が生じ、非常に難航していたものの、ようやく2匹が無事に産出されている。(4年目→) 昨年度末に生まれてきた CAG-Ratbow を増やして、ラインの数を整えた。CAG-Ratbow の樹立が難航していたので、並行して新たなレポーターラインの確立も開始した。これまでには全身性及び神経細胞に着目したドライバーだったが、近年研究が進んできているアストロサイトを標識するドライバーラットが存在しなかつた。そこで全アストロサイトのマーカーである Aldh1l1 locus に CreERT2 を組み込んだ、アストロサイト標識用ドライバーラットの作製にも着手した。CreERT2 系統は、Cre-ERT2 は、部位特異的組換え酵素 Cre リコンビナーゼと、改変型エストロゲン受容体 (ERT2) を融合させた人工タンパク質である。平常時は Cre-ERT2 は細胞質に留まり、核内に移行しないため活性がないため、標的遺伝子の組換えは起きないが、タモキシフェン（またはその活性代謝物 4-OHT）を投与すると、タモキシフェンが ERT2 に結合し、核内に移行可能となり組み換えが生じる。これまでに Aldh1l1-CreERT2 ラット産子を得ていて、RT-PCR により、脳内での Cre 発現を確認している。また、現在、本産子を CAG-EGFP-floxed mCherry ラット系統と交配し、4-OHT の胎生期、および生後の投与により組み換えが起きるかの条件検討を行っている。最適化後、CAG-Ratbow を用いて発現を確認する。この様に、本研究期間内に、3つのプロモーターを持つ Ratbow 及び Cre ラインの作製と検証を行ってきた。これらのラットラインは、今後ラットをモデルとした様々な研究に展開できると期待している。