



東北大学



2016年5月20日

東北大学大学院医学系研究科
東北大学大学院生命科学研究所

細胞/臓器/個体を自在に光らせる！ 世界初の赤色蛍光レポーターラット

【研究概要】

東北大学大学院医学系研究科の神経細胞制御学分野五十嵐 敬幸（いがらしひろゆき）博士課程大学院生、生命科学研究所（医学系研究科協力講座）八尾 寛（やおひろむ）教授らのグループは、遺伝子組換え Cre/loxP システム^{注1}を利用して特定細胞集団を赤色蛍光タンパク質（tdTomato）^{注2}により可視化できるトランスジェニックラット^{注3}、及び全身性に tdTomato を発現するトランスジェニックラット（Flame rat, フレイムラット）の作製に成功しました。今後、Cre を特定細胞において発現するラット系統の作製を促進することで、脳の神経細胞のつながりを明らかにするコネクトミクス研究や、細胞/組織移植治療の発展に貢献することが期待されます。この研究成果は、医学を含む科学分野全般に高く評価されている米国のフリー・アクセス学術誌 PLOS ONE に、5月19日午後2時（米国東部時間、日本時間5月20日午前3時）に掲載されました。

本研究は、科学研究費・新学術領域研究「包括型脳科学研究推進支援ネットワーク」のリソース・技術支援「脳機能研究へ向けたトランスジェニックラットの開発（小林和人、福島県立医科大学教授）を受けて行いました。

【研究のポイント】

- 世界初の実用レベルの蛍光レポーターラットの開発に成功した。
- 全身性に赤色蛍光を発現する Flame rat を樹立した。
- ヒト・モデル系としてラット・Cre/loxP システム研究を促進する。
- コネクトミクス、移植研究の促進に貢献する可能性がある。

【研究内容】

私たちを構成する細胞は、組織・臓器によって様々な機能を発揮し、日常生活において時々刻々と変化しています。例えば、脳を構成する神経細胞では、学習により微小な構造が変わり、神経細胞同士の繋がりが変化しています。また、病気では病態に応じて細胞が健康な状態とは異なる形態を示す場合があります。このような細胞の変化を形として捉える上で、蛍光タンパク質を用いて特定の細胞を可視化する技術（Cre/loxP・レポーターシステム）が非常に有効となります。この技術を用いた遺伝子組換え動物の作製は、生体内における遺伝子の役割を解明するにあたり不可欠の方法論になっています。

今回研究対象としたラットは、マウスに比べて体が非常に大きいことから外

科的処置が容易で、生理的特徴がヒトにより近く、学習能力が高いことから高度な行動実験を行うことができるという、ヒト・モデル系としての利点を有しています。しかし、Cre/loxP・レポーターシステムがマウスにおいて確立しているのに対し、ラットではこのシステムの開発が非常に遅れています。このような背景から、Cre/loxP・レポーターシステムを利用した実用レベルのレポーターラット^{註4}の開発が喫緊の課題となっていました。

そこで我々は、Creの存在下でのみ赤色蛍光タンパク質 tdTomato を産生する tdTomato レポーターラットを新規に作製しました。このラットでは、組織・時期特異的に Cre を発現させ tdTomato の発現を誘導することで、特定の細胞・組織を赤色蛍光で可視化することができます(図1)。さらに、特定の細胞集団において Cre を発現するラットと交配させた場合、産仔ではその集団が赤く標識され、形態を詳細に追跡できます(図2、図3)。さらに、Cre を tdTomato レポーターラットの受精卵発現させたところ、全身において tdTomato を発現する新しい系統 FLAME (フレイム) ラットを作製することに成功しました(図4)。FLAME ラットの細胞は全て赤色蛍光を発現しており、励起光下で観察するとすべての臓器、組織が赤く光って見えます。

本研究は、細胞・臓器・個体を選択的に蛍光標識するレポーターラットを作製した、世界で最初の報告です。Cre/loxP システムの応用により、時期・組織特異的な遺伝子欠損の解析が可能となることから、tdTomato レポーターラットは様々な細胞集団を標的としたドライバーラット^{註5}の開発や、特定の神経細胞の投射を配線図として描き出すコネクティクス研究に貢献すると考えられます。また、FLAME ラットは細胞/組織/臓器移植研究において、その系譜解析に役立つことが期待されます。

これらのトランスジェニックラット系統は既にナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/Default_jp.aspx)に寄託され、国内外すべての研究者が利用できるリソースとして登録されています。

【登録情報】

- ・ tdTomato レポーターラット : NBRP-0734
- ・ FLAME rat : NBRP-0789, NBRP-0790

本研究は、東北大学大学院生命科学研究科、群馬大学、兵庫医科大学、昭和大学、自治医科大学との共同で行われました。また、本研究は、科学研究費・新学術領域研究(25115701、15H01413)、挑戦的萌芽研究(25670103、15K15025)、基盤研究(A)(25250001)、科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業(CREST)、Subsidies for Private Universities、学際高等研究教育院研究費の支援を受けて行われました。

【用語説明】

- 注 1. Cre/loxP (クレ・リコンビナーゼ/ロックスピー) システム：
DNA 組換え酵素 Cre が loxP 配列と呼ばれる DNA 配列を認識して、2 つの loxP 配列に挟まれた配列を除去する部位特異的組換え反応を利用した遺伝子組換え実験システム。
- 注 2. tdTomato (ティーディートマト)：
極大波長 581nm を有する非常に明るい赤色蛍光タンパク質。赤色蛍光は波長の短い青色光などに比べて散乱しにくいので、組織中の観察に適している。
- 注 3. トランスジェニックラット：
特定の外部遺伝子を人為的に導入されたラット。
- 注 4. レポーターラット：
蛍光タンパク質を発現させることで特定の細胞・組織を可視化したトランスジェニックラット。
- 注 5. ドライバーラット：
特定の細胞・組織で Cre を発現させるトランスジェニックラット。

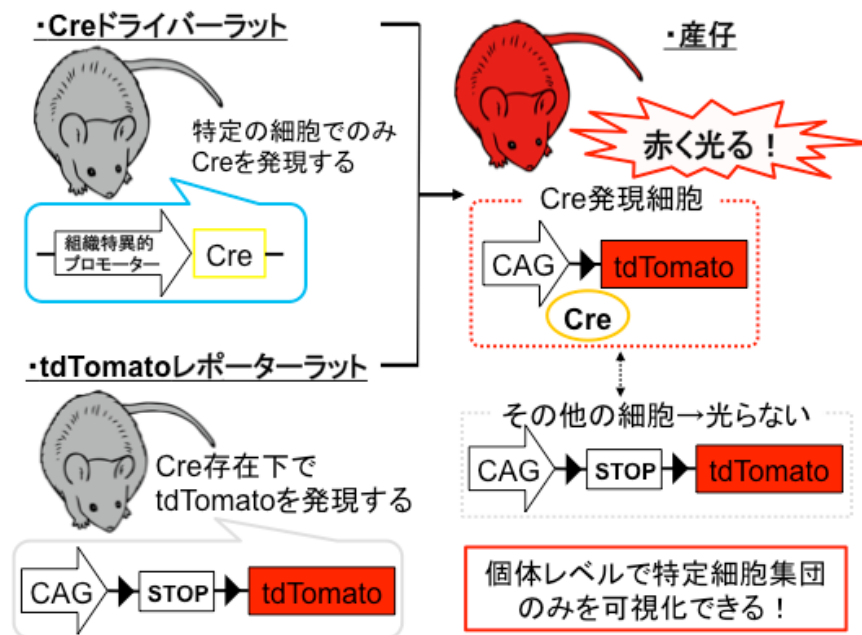


図 1. tdTomato レポーターラットが機能する仕組み

特定の細胞でのみ Cre を発現するドライバーラットと tdTomato レポーターラットを交配することで、特定細胞においてのみ tdTomato による赤色蛍光ラベルが観察される。

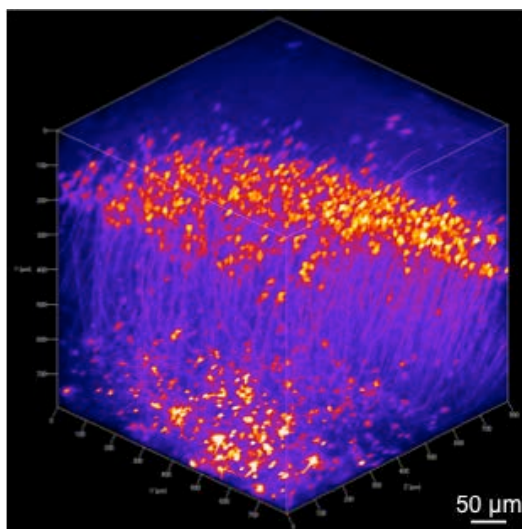


図2. 海馬神経細胞集団の蛍光三次元像

海馬に Cre を発現させ、組織を透明化した後、蛍光顕微鏡下で観察した。その像を三次元再構築したところ、tdTomato レポーターラットでは、Cre 発現神経細胞の樹状突起や軸索まで赤色蛍光にて可視化でき、その詳細な形態が観察できた。

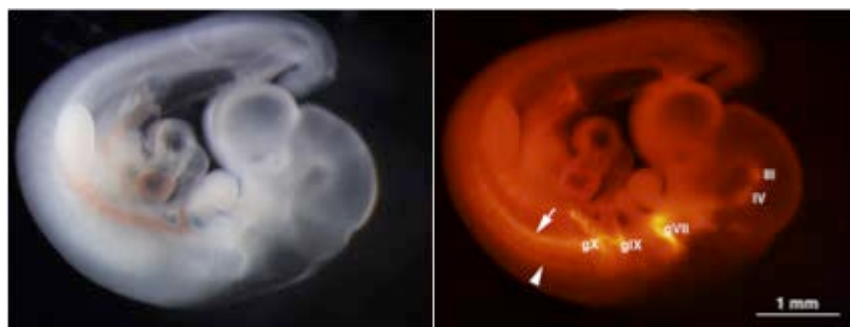


図3. Phox2B-Cre ドライバーラットと tdTomato レポーターラットの交配により得られた産仔（胎生 12.5 日目）

胎仔の像（左）と蛍光像（右）から、呼吸リズムの発生などに重要な Phox2B 陽性の神経細胞集団が赤色蛍光で可視化されていることが確認できた。



図 4. FLAME ラットの作製

雄の FLAME ラットと雌の野生型ラットの交配により得られた生後 4 日目の産仔。明視野での写真（左）では各個体に差が見られないが、蛍光像（右）では矢印で示された FLAME ラット個体のみが赤色蛍光を全身から発していることが確認できた。

【論文題目】

A novel reporter rat strain that conditionally expresses the bright red fluorescent protein tdTomato

Hiroyuki Igarashi, Kyo Koizumi, Ryosuke Kaneko, Keiko Ikeda, Ryo Egawa, Yuchio Yanagawa, Shin-ichi Muramatsu, Hiroshi Onimaru, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo

「コンディショナルに赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現する新規レポーターラット系統の開発」

五十嵐敬幸, 小泉協, 金子涼輔, 池田啓子, 江川遼, 柳川右千夫, 村松慎一, 鬼丸洋, 石塚徹, 八尾寛

掲載誌： PLOS ONE (フリーアクセス・オンラインジャーナル)

【お問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学大学院医学系研究科神経細胞制御学分野
博士課程大学院生 五十嵐 敬幸

電話番号：022-217-6210

E メール：hirobio@med.tohoku.ac.jp

(報道担当)

東北大学大学院医学系研究科・医学部広報室
講師 稲田 仁 (いなだ ひとし)

電話番号：022-717-7891

FAX 番号：022-717-8187

E メール：pr-office@med.tohoku.ac.jp