

マウスを用いた脳機能表現型データベースの開発

京都大学大学院医学研究科先端技術センター・藤田保健衛生大学総合医科学研究所
・自然科学研究機構生理学研究所行動様式解析室
宮川 剛

A brain-behavior phenotype database consisting of data derived from comprehensive behavioral analyses of genetically engineered mice

Tsuyoshi Miyakawa
Frontier Technology Center, Kyoto University Graduate School of Medicine

Since 99% of mouse genes have homologous in humans, a large-scale project that is aimed to encompass knockouts of every gene in mice is in progress. Approximately 80% of all genes are expressed in brain and, to investigate their function in individual organisms, we should investigate their functions in the brain. We can identify the genes that have significant impact on the brain functions efficiently by examining the final output level of gene function in the brain, that is, behavior. The influence of a given gene on a specific behavior can be determined by conducting behavioral analysis of mutant mice lacking that gene. In brain-behavior phenotyping, phenotype data should be obtained systematically with reasonably standardized methods, and the data obtained in such projects should be included in a public database. We have been developing a brain-behavior phenotypes database of mutant mice by using comprehensive and standardized phenotyping methods. The test battery covers sensori-motor functions, emotion, learning and memory, attention and so on. We have been constructing a relational database consisting of such data. So far, raw data of 21 tests from 90 strains, more than 5000 mice are stored in a FileMaker file (data for each strain will be disclosed after the publication of the data). The utilization of our database may provide a progress in understanding gene-brain-behavior relationship.

1. はじめに

マウスは、その遺伝子の99%がヒトでホモログを持つだけでなく、遺伝子の自在な操作が可能であり^[1-3]、個体レベルでの多彩な解析技術が適用できる^[4]。よって、マウスはヒト脳の統合的理解のためのモデル動物として最適であると考えられる^[5]。現在、様々な遺伝子改変マウスの脳機能表現型についての知見が日々報告されているが、標準化されていない実験手法による断片的知見の集積では、バイオインフォマティクスを適用した体系的な比較・解析ができず、ゲノム情報と脳機能をつなぐ全体像の把握は困難である。本研究開発では、マウスの網羅的行動テストバッテリーを用いた表現型解析から得られる脳機能表現型データをインフォマティクスの方法を用いて解析・利用可能にすることを目的として、データを取得する手法の標準化と、データベースの開発・整備・公開を行った。

2. 研究開発の成果

研究代表者らは過去4年半の間に、この分野で事実上国内最大の拠点として、60の共同研究により90系統以上、5000匹以上のマウスを行動解析し、新たな表現型を多数見出すとともに、網羅的行動テ

ストバッテリー (表1) について諸々の基礎的な知見を蓄積してきた。そのデータを活用すべく、情報の集積、基礎データの蓄積と解析を行い、マウスの脳機能表現型データ取得の手法の標準化に取り組んだ。

表1 行動テストバッテリーの項目

行動の種々の領域について、よく用いられている代表的なもので比較的簡便に実施可能なテストが選択してある。1系統につき、1~2ヶ月で第一段階のスクリーニングが可能となっている

テスト名称	測定項目
(1) general health/neurological screen	体重・直腸温測定・髭や毛皮の状態・各種反射
(2) wire hang	筋力
(3) grip strength test	筋力
(4) light/dark transition	不安様行動
(5) open field test	活動量・不安様行動・薬物感受性
(6) elevated plus maze	不安様行動
(7) hot plate	痛覚感受性
(8) social interaction test (novel environment)	社会的行動
(9) rotarod	協調運動・運動学習
(10) prepulse inhibition test	感覚-運動ゲーティング・聴覚・驚愕反応
(11) Porsolt forced swim test	鬱様行動
(12) Morris water maze	参照記憶・固執傾向・作業記憶など
(13) Barnes circular maze	参照記憶・固執傾向・作業記憶など
(14) eight-arm radial maze	作業記憶・参照記憶・固執傾向など
(15) T-maze	作業記憶・参照記憶・固執傾向など
(16) cued and contextual fear conditioning	文脈記憶など
(17) latent inhibition test	注意
(18) tail suspension test	鬱様行動
(19) gait analysis	歩行解析
(20) 24-hour home cage monitoring	24時間の活動性・サーカディアンリズム
(21) 24-hour social interaction test in home cage	ホームケージ内での社会的行動

網羅的行動テストバッテリーには行動の様々な領域についてよく用いられている代表的かつ比較的簡便に実施可能なテストが選択しており、またテストのほとんどは自動化されているため、ハイスループットな解析を可能としている。解析には標準化されたプロトコルが使用されており、異なる系統の遺伝子改変マウスの表現系について、その程度がどれほど顕著であるかを比較することも可能となっている。また、当研究室で使用しているプロトコルについてはその詳細をオンラインビデオジャーナル (Journal of Visualized Experiments) に順次公開しており、誰でも見る事が出来るようになっている (図1) [6]。

これまでに解析した遺伝子改変マウスの系統は90系統以上にのぼるが、興味深いことに脳で発現している遺伝子の遺伝子改変マウスはそのほとんどが何らかの行動異常を示している (図2) [4]。

行動解析の結果が論文として出版されたものについては代表者らが構築・運営するデータベースで全ての生データの公開を行う。現在は試験運用中であり、C57BL6の亜系統間の比較データと既に論文として出版された14の系統の遺伝子改変マウス (NFAT ノックアウトマウス [7]、NMDA 受容体 3B サブユニット



図1 Journal of Visualized Experiments より実験のプロトコルを動画で見ることが出来る (<http://www.jove.com/>)。図は Light/dark transition test のプロトコル紹介ムービー [6]

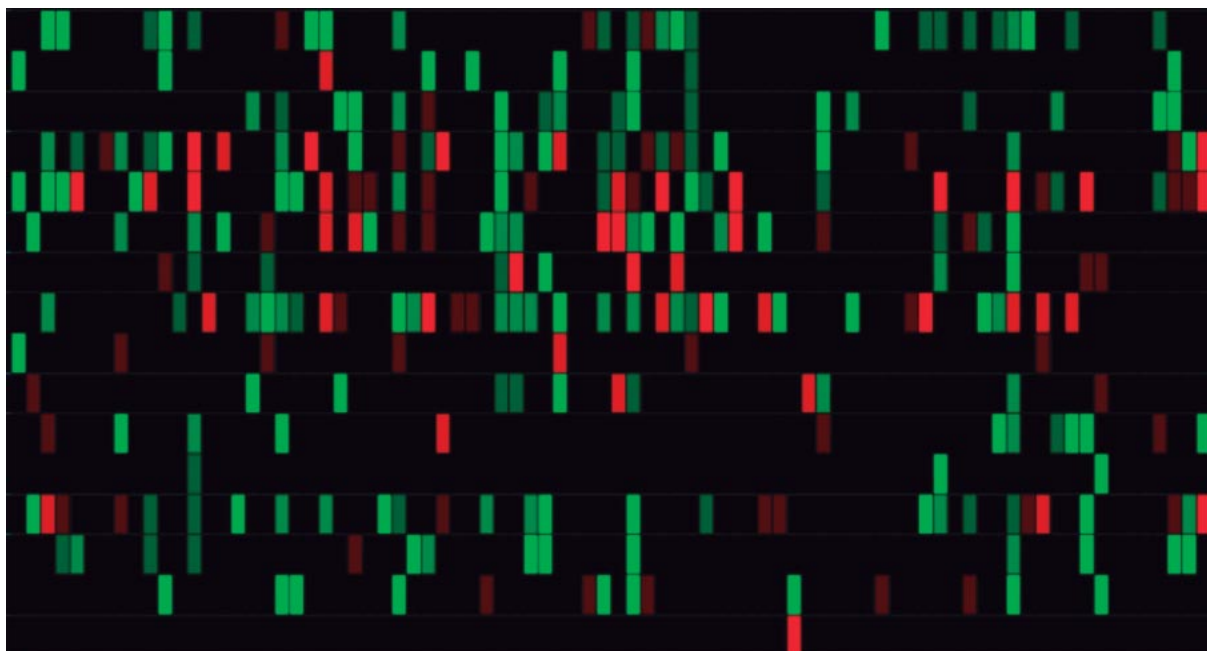


図2 筆者らの研究室でこれまでに得られたデータ
各列が遺伝子改変マウスの各系統で、各行は網羅的行動テストバッテリーでの行動の 카테고리を表す。野生型 v.s. ミュータントで、増減を赤と緑で示した。色の明るさは統計的な有意差を表す。明るい順に $p < 0.001$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$

ノックアウトマウス^[8]、phosphodiesterase 10A2 ノックアウトマウス^[9]、Sept4 ノックアウトマウス^[10]、Neuropilin ノックアウトマウス^[11]、tamalin ノックアウトマウス^[12]、Fez1 ノックアウトマウス^[13]、Ywhae ノックアウトマウス^[14]、Kf-1 ノックアウトマウス^[15]、Nestin-DTA による神経幹細胞除去マウス^[16]、CaMKII α ヘテロノックアウトマウス^[17]、Calpastatin ノックアウトマウス^[18]、protocadherin- α ノックアウトマウス^[19]、dysbindin-1 欠失マウス^[20]、そして論文投稿前あるいは投稿中の4系統の遺伝子改変マウスの合計18系統、1491匹分のデータがデータベースサイト (<https://behav.hmro.med.kyoto-u.ac.jp/>)

で試験的に限定公開している(図3)。論文出版前のデータについては、必要に応じて論文の査読者が参照できるようにすることを試みている。今後出版される遺伝子改変マウスの系統についても順次データを公開する予定である。また、本研究開発で網羅的行動テストバッテリーを用いて解析を行ったマウスについては実験終了後、脳を取り出して凍結保存することを基本としている。この「行動データ付き脳」についても多くの共同研究者の協力を得てその数を増やしている。現在、1464匹分のマウスの脳が凍結あるいは固定された状態で保存されている。これらについてはリクエストがあれば提供研究者の了解のもとに使用することが出来るようになっている。

本研究開発では網羅的行動テストバッテリーを用いて各種の遺伝子改変マウスの解析を行い80系統以上、5000匹以上のマウスのデータを得た。これら蓄積されたデータの大規模メタ解析により、実験時刻・テスト間隔などの影響の検討を行った。様々な実験で計測される活動量は実験時間によって影響を受けていることが分かった。また、Elevated plus maze test ではケージ内での実験の順番によって大きく影

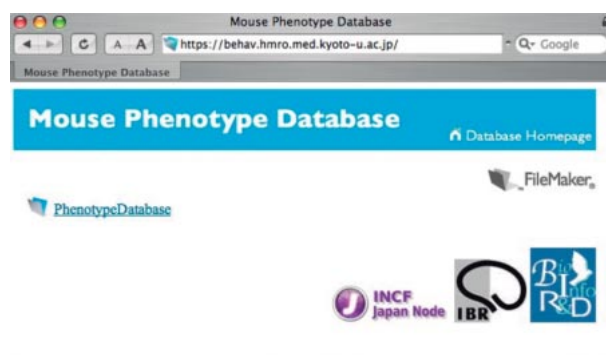


図3 Mouse Phenotype Database
論文として出版済のマウス系統についての実験データを試験的に限定公開している。閲覧はIDとパスワードによって制限している。また、接続はSecure Socket Layer (SSL)によって暗号化されている

響を受けることが分かった。これらの結果をふまえ、実験を行う場合には実験群と統制群とで、使う装置のみではなく、時間や順番についてもカウンターバランスを合わせる必要があることが分かった。また、各テストの指標についての因子分析や主成分分析を行った。一般的に Light/dark transition test と Elevated plus maze test は同じように不安様行動を測定する課題と考えられているが、それぞれのテストでの不安様行動の指標の相関はあまり高くなかった。また、うつ様行動のテストとして知られる Porsolt forced swim test と Tail suspension test についても指標の相関はあまり高くなく、因子分析ではそれぞれのテストについて別の因子が検出された。同じように不安様行動やうつ様行動を測定していると考えられているテストでもそれぞれに異なる側面を測定していると考えられ、我々が網羅的行動テストバッテリーに採用している実験の種類について理論的な裏付けがとれた。

研究代表者らは網羅的行動テストバッテリーで使用しているプロトコルを公開し、標準化の試みを進めているが、現実問題としては異なる研究サイトで行動実験のプロトコルを全く同一にするというのは難しいことも多いので、まずはプロトコルの記述方法の標準化をすることを理化学研究所の梶屋啓志、若菜茂晴らとともに検討している。プロトコルを詳細に記述できるフォーマットである Standardized Description of Operating Procedure (SDOP) を用いることで京都大学、理化学研究所(筑波)、国立遺伝学研究所の各研究室の間でプロトコルの共有を図っている(図4)。

プロトコルの共有やその他の共同研究に際しては研究者同士の密な情報交換やコミュニケーションが必須であるが、実際に会合を開いて話し合うという事は頻繁にはできることではない。特定領域研究「統合脳5領域」のデータベース委員会によって神経科学・脳科学に関わる研究者の情報交換・コミュニケーションの促進のために「神経科学者 SNS (ソーシャルネットワークングサービス)」が運営されており(<http://ibr.pne.jp/>)、代表研究者である宮川らが管理を行っている。代表研究者らはこの SNS 上に「マウス表現型解析コンソーシアム全般」というコミュニティを作っており、現在 83 名が参加してマウスでの表現型解析について活発な議論を行っている(図5)。このコミュニティは参加に承認が必要な形となっているが議論は公開されており、行動実験に関する基礎的な質問から実験の解釈に関わる高度な議論などまであり、活発に運用されている。現在、神経科学者 SNS は参加者が 1227 名で、脳神経科学に興味のある研究者であれば参加可能で、日本国内に限らずアメリカやヨーロッパに在住の日本人研究者からも利用されている。神経科学者 SNS のアクセス解析には Google analytics を用いており、単

SDOP schema	RKEN GEC	Kyoto Univ	NIG	EMPRESS Sim
Information				
Open-field analysis				
environment of testing room				
room temperature	20-24	23	21-25	N.D.
room moisture	45-65	N.D.	40-60	N.D.
noise in room	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
equipment				
open-field arena		Link		
shape of arena	box	box	box	box
size of arena				
depth (cm)	40	40	60	no smaller than 40
width (cm)	40	40	60	no smaller than 40
height (cm)	30	30	40	approximately 50 cm
luminance of arena				
at the center (lux)	less than 90	100	365	150-200
at the corner (lux)	less than 90	100	N.D.	N.D.
floor				
wall				
measuring device		VideoMax Animal Activity Monitoring System (Accuscan Instruments, Japan)	Image OF (O'hara, Japan)	Video-tracking system: An automated video tracking system of beam breaks should be employed to bi...

図4 Standardized Description of Operating Procedure 異なる場所で得られた実験データを比較可能にするため、各実験サイトでのプロトコルを統一された方法で記述する試みを行っている

図5 神経科学者 SNS より「マウス表現型解析コンソーシアム全般」コミュニティではマウスの行動実験についての質問をすることが出来るようになっている

純なアクセスの回数をはじめ、アクセスの時間帯や曜日、地域などの情報を得ることが出来るようになってきている。アクセス解析を開始した2007年8月以来からの総ページビューは442,316回(9/28現在)となっており、これは1ヶ月あたりに均すと3万回以上アクセスされていることになる。SNSのコミュニティ上で研究についてのディスカッションが行われ、またそれをきっかけに共同研究が行われており、今後このようなSNSの重要性が高まると考えられる。

3. まとめ

本研究開発では脳機能総合的研究において極めて重要となるマウス個体レベルでの網羅的行動解析を標準化し、表現系解析によって得られる膨大なデータをバイオインフォマティクス的手法を用いて利用できるよう、データベースの開発・整備・公開を進めてきた。本研究開発終了後もデータベースについては継続して運営し、さらにデータを追加し、整備を進めていく予定である。この実績などを基盤に、マウスをモデル動物とした研究を起点としたヒト脳機能の総合的研究を全国的な組織が形成されることが期待できる。また、本研究開発の成果により、ゲノム情報やヒト脳機能に関する他のバイオインフォマティクス(ヒト脳のイメージングや、精神・神経疾患や認知機能等の人類遺伝学的研究など)との連携、新たな組織化が可能となり、ヒト脳機能の総理解への新たな科学的展開が可能となるのではないかと期待される。

4. 研究開発実施体制

代表研究者 宮川 剛(京都大学大学院医学研究科先端技術センター)

研究開発題目

(1) マウスを用いた脳機能表現型データベース開発

グループリーダー 宮川 剛(京都大学大学院医学研究科先端技術センター)

5. 参考文献

- [1] Mishina, M. and Sakimura, K., *Conditional gene targeting on the pure C57BL/6 genetic background*. *Neurosci Res*, 2007. **58** (2) : p. 105-12.
- [2] Aiba, A. and Nakao, H., *Conditional mutant mice using tetracycline-controlled gene expression system in the brain*. *Neurosci Res*, 2007. **58** (2) : p. 113-7.
- [3] Kobayashi, K., *Controlled cell targeting system to study the brain neural circuitry*. *Neurosci Res*, 2007. **58** (2) : p. 118-23.
- [4] Takao, K., Yamasaki, N., and Miyakawa, T., *Impact of brain-behavior phenotyping of genetically-engineered mice on research of neuropsychiatric disorders*. *Neurosci Res*, 2007. **58** (2) : p. 124-32.
- [5] Aiba, A., Inokuchi, K., Ishida, Y., Itoharu, S., Kobayashi, K., Masu, M., Mishina, M., Miyakawa, T., Mori, H., Nakao, K., Obata, Y., Sakimura, K., Shiroishi, T., Wada, K., and Yagi, T., *Mouse liaison for integrative brain research*. *Neurosci Res*, 2007. **58** (2) : p. 103-4.
- [6] Takao, K. and Miyakawa, T., *Light/dark transition test for mice*. *J Vis Exp*, 2006 (1) : p. 104.
- [7] Arron, J.R., Winslow, M.M., Polleri, A., Chang, C.P., Wu, H., Gao, X., Neilson, J.R., Chen, L., Heit, J.J., Kim, S.K., Yamasaki, N., Miyakawa, T., Francke, U., Graef, I.A., and Crabtree, G.R., *NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21*. *Nature*, 2006. **441** (7093) : p. 595-600.
- [8] Niemann, S., Kanki, H., Fukui, Y., Takao, K., Fukaya, M., Hynynen, M.N., Churchill, M.J., Shefner, J.M.,

- Bronson, R.T., Brown, R.H., Jr., Watanabe, M., Miyakawa, T., Itohara, S., and Hayashi, Y., *Genetic ablation of NMDA receptor subunit NR3B in mouse reveals motoneuronal and nonmotoneuronal phenotypes*. Eur J Neurosci, 2007. **26** (6) : p. 1407-20.
- [9] Sano, H., Nagai, Y., Miyakawa, T., Shigemoto, R., and Yokoi, M., *Increased social interaction in mice deficient of the striatal medium spiny neuron-specific phosphodiesterase 10A2*. J Neurochem, 2008. **105** (2) : p. 546-56.
- [10] Ihara, M., Yamasaki, N., Hagiwara, A., Tanigaki, A., Kitano, A., Hikawa, R., Tomimoto, H., Noda, M., Takanashi, M., Mori, H., Hattori, N., Miyakawa, T., and Kinoshita, M., *Sept4, a component of presynaptic scaffold and Lewy bodies, is required for the suppression of alpha-synuclein neurotoxicity*. Neuron, 2007. **53** (4) : p. 519-33.
- [11] Horii, Y., Yamasaki, N., Miyakawa, T., and Shiosaka, S., *Increased anxiety-like behavior in neuropsin (kallikrein-related peptidase 8) gene-deficient mice*. Behav Neurosci, 2008. **122** (3) : p. 498-504.
- [12] Ogawa, M., Miyakawa, T., Nakamura, K., Kitano, J., Furushima, K., Kiyonari, H., Nakayama, R., Nakao, K., Moriyoshi, K., and Nakanishi, S., *Altered sensitivities to morphine and cocaine in scaffold protein tamalin knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104** (37) : p. 14789-94.
- [13] Sakae, N., Yamasaki, N., Kitaichi, K., Fukuda, T., Yamada, M., Yoshikawa, H., Hiranita, T., Tatsumi, Y., Kira, J.I., Yamamoto, T., Miyakawa, T., and Nakayama, K.I., *Mice lacking the schizophrenia-associated protein FEZ1 manifest hyperactivity and enhanced responsiveness to psychostimulants*. Hum Mol Genet, 2008. **17** (20) : p. 3191-3203.
- [14] Ikeda, M., Hikita, T., Taya, S., Uruguchi-Asaki, J., Toyo-Oka, K., Wynshaw-Boris, A., Ujike, H., Inada, T., Takao, K., Miyakawa, T., Ozaki, N., Kaibuchi, K., and Iwata, N., *Identification of YWHAE, a gene encoding 14-3-3epsilon, as a possible susceptibility gene for schizophrenia*. Hum Mol Genet, 2008. **17** (20) : p. 3212-3222.
- [15] Tsujimura, A., Matsuki, M., Takao, K., Yamanishi, K., Miyakawa, T., and Hashimoto-Gotoh, T., *Mice lacking the kf-1 gene exhibit increased anxiety- but not despair-like behavior*. Front Behav Neurosci, 2008. **2** : 4.
- [16] Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., and Kageyama, R., *Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain*. Nat Neurosci, 2008. **11** (10) : p. 1153-61.
- [17] Yamasaki, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kajii, Y., Maeda, J., Soma, M., Takao, K., Tanda, K., Ohira, K., Toyama, K., Kanzaki, K., Fukunaga, K., Sudo, Y., Ichinose, H., Ikeda, M., Iwata, N., Ozaki, N., Suzuki, H., Higuchi, M., Suhara, T., Yuasa, S., and Miyakawa, T., *Alpha-CaMKII deficiency causes immature dentate gyrus, a novel candidate endophenotype of psychiatric disorders*. Mol Brain, 2008. **1** : 6.
- [18] Nakajima, R., Takao, K., Huang, S.M., Takano, J., Iwata, N., Miyakawa, T., and Saido, T.C., *Comprehensive behavioral phenotyping of calpastatin-knockout mice*. Mol Brain, 2008. **1** : 7.
- [19] Fukuda, E., Hamada, S., Hasegawa, S., Katori, S., Sanbo, M., Miyakawa, T., Yamamoto, T., Yamamoto, H., Hirabayashi, T., and Yagi, T., *Down-regulation of protocadherin- a, A isoforms in mice changes contextual fear conditioning and spatial working memory*. European Journal of Neuroscience, in press.
- [20] Takao, K., Toyama, K., Nakanishi, K., Hattori, S., Takamura, H., Takeda, M., Miyakawa, T., and Hashimoto, R., *Impaired long-term memory retention and working memory in sdy mutant mice with a deletion in Dtnbp1, a susceptibility gene for schizophrenia*. Mol Brain, in press.