

第52回岡山実験動物研究会

平成18年12月8日(金)午後1時30分から午後5時25分までピュアリティまきびで日本生物工学会会西日本支部の協賛で開催された。はじめに会長の倉林譲先生から開会のあいさつがあり、その後、特別講演1に移った。特別講演1は「実験動物としてのショウジョウバエ」と題して百田龍輔先生(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・人体構成学)が講演された。この司会は浅田伸彦先生(岡山理科大学理学部)が担当された。講演終了後に、休憩を取り、事務局から会務報告があった。

- ① 平成17年度の活動は、第49回および第50回研究会の2回研究会を開催した。第49回研究会は岡山理科大学の浅田伸彦先生のお世話で、6月24日(金)13:30から17:10まで岡山理科大学創立40周年記念館(第25号館)8号ホールで開催された。第50回研究会は12月2日(金)の13:30から日本生物工学会西日本支部の協賛で、ピュアリティまきびで開催した。
- ② 平成18年度の活動としては、第51回および第52回研究会の2回研究会を開催した。第51回研究会はノートルダム清心女子大学の中永征太郎先生・高橋正佑先生のお世話でノートルダム清心女子大学で開催した。第52回研究会は本日(12月8日)、ピュアリティまきびで開催している。研究会報(第23号)の発行を進めている。会則第7条および第9条に則り平成19年~20年度の役員を選任を行った。2期4年間にわたって会長を務められた倉林譲先生は理事に復帰され、新会長には三谷恵一先生(当研究会理事、環太平洋大学・教授)が選任された。新たに理事に大熊誠太郎先生(川崎医科大学薬理学教室・教授・中央研究部・医用生物センター長)、常務理事に辻岳人先生(岡山大学大学院自然科学研究科・動物遺伝解析学)、監事に高橋純夫先生(岡山大学大学院自然科学研究科・生体制御科学・教授)が選任され、長年にわたって役員を務められた高橋正佑先生(理事)、河本泰生先生(監事)は任期を終えられた。理事会・常務理事会は各々2回開催した。平成18年5月11日~13日、神戸国際会議場で開催された第53回日本実験動物学会総会(大会長:倉林譲先生)の後援と協力を行った。
- ③ 平成18年度の会計収支中間報告(1月1日~12月7日)
収入総額は835,328円(前年度繰越金465,321円含む)、これに対して支出総額は339,514円となり、残高は495,814円となった。
- ④ 平成19年度の活動計画としては、2回(第53回、第54回)の研究会の開催、第24号の会報

発行、理事会・常務理事会の開催、ホームページの開設、会報バックナンバー(第1号~第23号)の製本を予定している。

会務報告後、特別講演2に移った。特別講演2は「黒色鶏やカラスはなぜ黒い?~下垂体中葉を欠く鳥類に体色制御の α -MSH調節系は存在するか?」と題して竹内 栄先生(岡山大学大学院自然科学研究科・理学部)が講演された。この司会は国枝哲夫(岡山大学理学部)が担当した。記念講演は「食物繊維とエネルギー値」と題して、当研究会の監事で平成19年3月にご退官される中永征太郎先生(ノートルダム清心女子大学)が講演された。この司会は倉林 譲先生(岡山実験動物研究会会長・岡山大学客員研究員)が担当された。

記念講演終了後、17:40から同会場で懇親会が持たれ、講師の先生を交えて会員相互の親睦を深め、和やかなうちに閉会した。

特別講演1

実験動物としてのショウジョウバエ

百田 龍輔

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・人体構成学

分子生物学とさまざまなデータベースのおかげで、次々に新しい遺伝子が見つかり、その生物学的な機能についてコンピューター上で予測し、それを試験管内で検証することが効率的になった。しかし、最も重要なのは、それらの現象を実験動物を用いて実際に生体内で検証することであるが、それは依然として、大変な労力を伴うものである。ポストゲノム時代と呼ばれ、膨大な数の遺伝子と直面している現在、このプロセスを迅速に進める必要がある。さまざまな実験動物が存在するが、ここでは私が現在扱っているショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)を取り上げたい。ショウジョウバエは、約100年にも及ぶ遺伝学の歴史があり、その結果、多種の系統が維持されている。ここでは、ショウジョウバエの実験動物としての特徴、さまざまな解析を中心に話をしたい。また、ショウジョウバエが疾患モデルとして用いられた例、そして、私自身が行った研究について話をしたいと思う。

特別講演2

黒色鶏やカラスはなぜ黒い? ~下垂体中葉を欠く鳥類に体色制御の α -MSH調節系は存在するか?

竹内 栄

岡山大学大学院自然科学研究科・理学部

解析学、アメリカ国立衛生研究所、リエージュ大学・獣医学)が講演された。この司会は内藤一郎先生(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・人体構成学)が担当された。

一般講演終了後に、休憩を取り、事務局から会務報告があった。

① 平成18年度の活動として、第51回および第52回研究会の2回研究会を開催した。第51回研究会はノートルダム清心女子大学の中永征太郎先生・高橋正佑先生のお世話でノートルダム清心女子大学で開催した。第52回研究会は日本生物工学会西日本支部の協賛で12月8日にピュアリティまきびで開催した。研究会報(第23号、62頁)を12月に発行し、翌年1月に会員へ発送した。会則第7条および第9条に則り平成19年～20年度の役員を選任を行った。5月11日～13日、神戸国際会議場で開催された第53回日本実験動物学会総会(大会長:倉林 譲先生)の後援と協力を行った。理事会は6月23日、12月8日の2回、常務理事会は4月25日、11月1日の2回開催した。

② 平成18年度の会計収支決算報告(1月1日～12月31日)

収入総額は865,328円(前年度繰越金465,321円含む)、これに対して支出総額は455,751円となり、残高は409,577円となった。

③ 平成19年度の活動としては研究会を2回(第53回、第54回)行う計画であるが、第53回研究会は本日(6月22日)、岡山大学創立五十周年記念館で開催している。第54回研究会は11月30日(金)、ピュアリティまきびで開催を予定している。第24号会報は11月に発行を予定している。理事会・常務理事会はすでに6月22日、5月7日にそれぞれ開催しているが、後1回ずつ開催する予定である。ホームページの開設、会報バックナンバー(第1号～第23号)の製本、会員の拡大などについて検討する。

④ 平成19年度の会計収支中間報告(1月1日～6月20日)

収入総額は761,630円(前年度繰越金409,577円含む)、これに対して支出総額は255,155円となり、残高は506,475円となった。

会務報告後、教育講演に移った。教育講演は「ナノテクノロジー材料の安全性問題を認識するために(調査報告)」と題して嶋村三智也氏(柘クラレ・倉敷研究所 構造解析グループ)が講演された。この司会は国枝(岡山大学大学院自然科学研究科・動物遺伝解析学)が担当した。引続いて、特別講演が行われた。特別講演は「倫理的動物実験の実践に向けて～動物実験関係者の社会的責任を明確に、具体的に～」と題して北 徳先生(倉敷芸術科学大学生命科学科非常勤講師、元川崎医科大学医用生物センター)が講演された。この司会は佐藤(岡

山大学大学院自然科学研究科・家畜育種学)が担当した。特別講演終了後、会場をピーチユニオン(岡山大学生協)に移して懇親会が開催された。

一般講演(1)

ラットの学習・記憶の サーカディアンリズムに関する検討

藤高浩輝・益岡尚由・三上 梓・亀井千晃
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・薬効解析

【目的】脳内のコリン神経系は学習・記憶に重要な働きを果たしていると考えられている。また、コリン神経系の伝達物質、酵素および受容体はサーカディアンリズムと関連することが報告されている。しかし、学習・記憶のサーカディアンリズムについて検討した報告はほとんど見られない。そこで、本研究では明期(7:30-10:00)と暗期(19:30-22:00)でのアセチルコリン関連化合物の効果を検討した。また、サーカディアンリズムの中核である視交叉上核を破壊することにより、これらの化合物の効果がいかなる影響を与えるか否かについて検討した。

【方法】1群18匹のWistar系雄性ラットを用いた。これらのラットは12時間毎の明暗サイクルで飼育し、食餌制限を行い、水は自由に摂取させた。空間記憶学習は8方向放射状迷路を用い、記憶障害の指標として、総エラー数、参照記憶エラー数、作業記憶エラー数を用いた。サーカディアンリズムを消失させる目的で両側視交叉上核を電氣的に破壊した。用いた薬物はスコポラミンおよびドネペジルであり、スコポラミンは試行30分前に腹腔内投与した。ドネペジルは試行1時間前に経口投与し、スコポラミン誘発記憶障害に対する効果を検討した。

【結果・考察】記憶障害を起こすスコポラミンおよび記憶障害を改善するドネペジルは明期のほうが暗期より効果が強力であった。また、視交叉上核を破壊してサーカディアンリズムを消失させたラットにスコポラミンおよびドネペジルの投与すると明期ならびに暗期の間の有意差は認められなくなった。以上の成績より、スコポラミンの記憶障害作用ならびにドネペジルの記憶改善作用の明暗差における違いは、サーカディアンリズムと密接に関連していることが判明した。

一般講演(2)

マウス卵胞基底膜の IV型コラーゲン α 鎖構成

中野和代・内藤一郎・百田龍輔・大塚愛二

【目的】

基底膜には多様な細胞外マトリックスが存在する。IV型コラーゲンは基底膜の骨組みとなる成分で、基底膜に力学的な強さを与え、また物質透過性に重要と考えられている。IV型コラーゲンには6種の α 鎖が存在するが、ウシ卵巣基底膜には6種類すべての α 鎖が存在し、卵胞発育とともに構成 α 鎖が減少することがわかっている。

今回、卵胞発育に伴う構成 α (IV)鎖の変化をマウス卵巣を用いて観察し、合わせて α 3(IV)鎖遺伝子ノックアウトマウス(col4a3KO)、 α 6(IV)鎖遺伝子ノックアウトマウス(col4a6KO)での卵巣基底膜構成 α (IV)鎖を解析した。さらに、col4a3KOとcol4a6KOの卵巣の形態を野生型と比較検討した。

【方法・材料】

解析には我々が開発したIV型コラーゲン α 鎖特異抗体を使用した。二次抗体にはFITC標識抗rat IgG抗体(サンタクルーズ社)を使用し、蛍光抗体法間接法で免疫組織学的解析を行った。また、卵巣切片のHematoxylin-Eosin染色を行い、卵巣の形態的な変化を検討した。

【結果・考察】

野生型マウスでは、 α 1(IV)鎖と α 2(IV)鎖は原始卵胞から一次、二次、成熟卵胞に至るすべての段階に存在した。一方 α 3(IV)鎖と α 4(IV)鎖は原始卵胞と一次卵胞には存在したが、二次卵胞以降は消失した。 α 5(IV)鎖と α 6(IV)鎖は発育とともに減少し、しかし二次卵胞の時期まで残存した。また、閉鎖卵胞には α 3(IV)鎖 \sim α 6(IV)鎖が残存する傾向が認められた。この結果は、これまでのウシ卵胞での結果とほぼ同じであった。 α 4(IV)鎖と α 3(IV)鎖は他の α 鎖に比べシステインが多く存在し、これが元でより強固な基底膜を形作ることが知られている。この α 鎖の存在が次のステップへの発育を抑制しているものと考えられる。

col4a3KOマウス卵胞では原始卵胞と一次卵胞鎖での α 3(IV)鎖と α 4(IV)鎖が消失した。col4a6KOMaus卵胞ではすべての発育段階の α 6(IV)鎖は消失し、しかし原始卵胞と一次卵胞鎖での α 5(IV)鎖は存在した。これらの結果から、卵胞のIV型コラーゲンには糸球体基底膜に存在する α 3/ α 4/ α 5分子と皮膚や腸管基底膜の α 5/ α 5/ α 6分子が存在することが明らかとなった。

以上の2種類のノックアウトマウスでの卵巣の形態には特に異常は認められなかった。また、黄体も形成されていることから排卵も行われており、また出産も認められている。

【結果・考察】

以上、マウス卵胞での α 鎖構成を明らかにし、 α 3/ α 4/ α 5と α 5/ α 5/ α 6の分子を形成することを示す

ことができた。しかし、これらの α 鎖(分子種)がどのように卵胞発育に寄与するのかが不明である。

一般講演(3)

Limbinノックアウトマウスが呈する
骨形成異常に関する解析

稲本政隆¹⁾・辻岳人¹⁾・神谷宣広²⁾・竹田晴子³⁾・
三品裕司²⁾・国枝哲夫¹⁾

¹⁾岡山大学大学院自然科学研究科・

²⁾アメリカ国立衛生研究所・

³⁾リエージュ大学獣医学部

【背景および目的】

我々はこれまでに和牛に見られる軟骨異形成性矮小体軀症の原因遺伝子として新規の遺伝子であるLIMBIN(LBN)を同定した。最近ではLBNは軟骨低形成と短肢症を特徴とするヒトのEllis-van Creveld症候群の原因遺伝子のひとつであることが報告されている。これまでにLbnは骨組織において発現することが確認されているものの、他の遺伝子との相同性は全くなく、その機能については解明されていない。本研究では、Lbnノックアウトマウスを用いて、形態学および組織学的解析を行うことでLbnの骨成長における役割について解析を行うとともに、Ellis-van Creveld症候群のモデル動物として有用であるかを検討した。

【方法】

Lbnノックアウト(KO)マウスについて、胎齢18.5日および4週齢個体において骨格標本作製し野生型マウスと比較した。1週齢、3週齢、5週齢の脛骨成長板においてH.E染色、Von Kossa染色、TRAP染色を行った。また、BrdUの取り込みによる増殖軟骨細胞の増殖活性についても解析を行った。

【結果】

生後直後のKOマウスでは外見上の差が認められないが、1週齢以降から体長・体重共に顕著な差がみとめられ矮小を呈した。また、KOマウスでは四肢長管骨の成長遅延が顕著であり、脛骨成長板では各軟骨細胞層は存在するものの、配列の乱れ、肥大軟骨細胞層の減少、増殖軟骨細胞の増殖活性の低下が観察された。さらに、KOマウスでは著しく海綿骨が減少しており、破骨細胞数の増加が観察された。

【考察】

Lbnは軟骨細胞の増殖・分化および骨形成の制御に関与していることが考えられた。また、KOマウスの表現型はEllis-van Creveld症候群の患者に認められる軟骨低形成や短肢症などの症状と類似しており、モデル動物として有用であることが示唆された。

period のリズム発現機構における機能解析」と題して富岡憲治先生（岡山大学大学院自然科学研究科バイオサイエンス専攻・教授）が講演された。この司会は浅田伸彦先生（岡山理科大学理学部）が担当された。講演終了後、休憩を取った後に、事務局から会務報告があった。

- ① 平成 18 年度の活動は、第 51 回および第 52 回研究会を開催した。第 51 回研究会は 6 月 22 日にノートルダム清心女子大学の中永征太郎先生・高橋正佑先生のお世話でノートルダム清心女子大学で開催した。第 52 回研究会は日本生物工学会西日本支部の協賛で 12 月 8 日、ピュアリティまきびで開催した。研究会報（第 23 号）を 12 月に発行し、今年 1 月に会員へ発送した。会則第 7 条および第 9 条に則り平成 19 年～20 年度の役員を選任を行った。理事会は 6 月 23 日、12 月 8 日の 2 回、常務理事会は 4 月 25 日、11 月 1 日の 2 回開催した。5 月 11 日～13 日、神戸国際会議場で開催された第 53 回日本実験動物学会総会（大会長：倉林 譲先生）の後援と協力を行った。
- ② 平成 19 年度の活動としては、第 53 回、第 54 回の研究会を開催した。第 53 回研究会は 6 月 22 日（金）岡山大学創立五十周年記念館で開催した。第 54 回研究会は日本生物工学会西日本支部の協賛で本日（11 月 30 日）ピュアリティまきびで開催している。第 24 号の会報の編集・発行作業を進めていて、12 月発行を予定している。理事会は 6 月 22 日、11 月 30 日の研究会開催日に、常務理事会は 5 月 9 日、10 月 31 日に開催した。ホームページを開設することができた。会報バックナンバー（第 1 号～第 24 号）の製本については来年度予定している。
- ③ 平成 19 年度の会計収支中間報告（1 月 1 日～11 月 28 日）
収入総額は 808,630 円（前年度繰越金 409,577 円含む）、これに対して支出総額は 353,675 円となり、残高は 454,955 円となった。
- ④ 平成 20 年度の活動計画としては、2 回の研究会（第 55 回、第 56 回）を予定している。第 55 回研究会は会長の三谷恵一先生のお世話で 6 月 27 日（金）を第 1 候補日として環太平洋大学で開催を予定している。企画としてはアユモドキ（淡水魚）に関するシンポジウムあるいは講演会などを考えている。第 56 回研究会は 11 月 21 日（金）公共施設（ピュアリティまきび）で特別講演・記念講演（3 題）を企画・予定している。第 25 号研究会報の編集・発行（10 月）、役員を選任（任期は平成 21～22 年度）、ホームページの充実、会報バックナンバーの製本、会員の拡大などを計画している。

- ⑤ 開設した研究会のホームページについて理事の嶋村三智也氏から紹介があった。

会務報告後、特別講演 2 に移った。特別講演 2 は「性決定機構・性判別の研究から出発して—マウス、トゲネズミ、ウシ等に関するトピックス—」と題して須藤 鎮世先生（就実大学・薬学部 遺伝子解析学教授、株*i*GENE 代表取締役社長）が講演された。この司会は国枝（岡山大学大学院自然科学研究科・動物遺伝解析学）が担当した。その後、特別講演 3 が行われ、「糖尿病性壊疽に対するマゴットセラピーの可能性」と題して三井秀也先生（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・心臓血管外科講師）が講演された。この司会は内藤一郎先生（岡山大学大学院医歯薬総合研究科・人体構成学）が担当された。講演終了後、17:40 から同会場で懇親会が持たれた。事務局担当の国枝が司会を務め、会長の三谷恵一先生の挨拶、監事の中永征太郎先生の乾杯の音頭で会が始まり、講師の先生を交えて会員相互の親睦を深め、和やかなうちに閉会した。

特別講演 1

コオロギを実験動物とした生物時計の解析：時計遺伝子 *period* のリズム発現機構における機能解析

富岡 憲治
岡山大学大学院自然科学研究科
バイオサイエンス専攻

コオロギは直翅目に属する不完全変態昆虫であり、一般に比較的大型でしかも累代飼育が容易であり、歩行や虫鳴活動に明瞭な概日リズムを示すことや、温帯性のコオロギ類では光周性を示すことから、頻りに神経行動学や時間生物学の実験動物としてされている。

行動リズムの研究では、中枢神経系の構造が比較的単純であり、個々のニューロンがその形態により同定可能であること、外科手術等が容易に行えることなどの利点を生かして、特に時計の神経機構の解析が行われてきた。概日時計は複眼と脳との間に位置する一対の視葉にあり、歩行活動や虫鳴活動、複眼の感度、視覚性介在ニューロンの感度などの概日リズムを制御している。視葉は体外培養下でもその電気活動に主観的夜高く、昼低いリズムを表すので概日時計の座に間違いない。また、視葉外にも弱い概日振動体があることが、視葉切除後の光同調実験から示唆されている。光サイクルへ同調するための光受容器は、フタホシコオロギでは複眼のみであるが、マダラスズやニュージーランドウエタでは複眼以外にも光受容器の存在が示唆されている。左右一対の視葉時計は、

相互に時刻情報と光情報を交換することで同調しており、この同調系の神経機構や時間生物学的意義などが詳細に研究されている。

最近、フタホシコオロギでは、分子生物学的手法が開発されつつある。既に多数の遺伝子がクローニングされており、それらの遺伝子の 2 本鎖 RNA を用いた RNA 干渉法(RNA interference)により遺伝子発現のノックダウンが可能になっている。さらに、piggyBac などのトランスポゾンを用いた形質転換体の作成も試みられており、近い将来、生物時計や光周性の研究に応用できる可能性がある。この研究会では、最近われわれが試みている RNAi による、フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) の時計遺伝子 *period* (*per*) の機能解析を紹介したい。

幼虫頭部での解析により、*per* mRNA の発現量は、夜の始めにピークをもつリズムを示し、このリズムは恒暗・恒温条件下でも継続することが明らかとなり、*per* の時計機構への関与が示唆された。そこで、*per* dsRNA を用いた RNAi により、*period* 遺伝子の役割を検討した。幼虫への *per* dsRNA の投与により、*per* mRNA レベルは対照群の 25% にまで減少し、かつほとんどの個体で活動リズムが消失することがわかった。これらの結果はコオロギでも *per* がリズムの発現に重要な役割を担うことを示唆している。さらに、終令幼虫に *per* dsRNA を投与し、羽化後の活動リズムを明暗および恒暗条件下で計測した場合も、恒暗条件下で活動リズムも、時計部位である視葉の遠心性神経活動も無周期となることがわかった。これらの結果から、コオロギでは *period* が時計機構に必須であることが示唆された。また同時に、RNAi が時計遺伝子の機能解析に極めて有効な手段であることが確認された。

特別講演 2

性決定機構・性判別の研究から出発して マウス、トゲネズミ、ウシ等に関する トピックス

須藤 鎮世

就実大学 薬学部 遺伝子解析学

1. ウシ胚の性判別

PCR を利用したウシ胚の性判別に成功し、キットを市販した。Y 染色体特異的繰返し配列をクローニングしたときの策略をまず紹介する。

2. H-Y 抗原、血清学的雄抗原(SDM)、雄特異発現抗原(MEA)

非浸襲的な胚の性判別を目指して、HY 抗体の利用を考えた。ポリクローナル HY 抗体で得られた *Mea 1* (雄特異発現抗原 1 遺伝子) は精子形成過程

の後期で発現する。モノクローナル HY 抗体で得られた *Mea 2* (雄特異発現抗原 2 遺伝子) は精母細胞や精子細胞のゴルジ体で発現する。アクロソームを介した物質輸送に関与しているらしい。自己免疫疾患 SLE の患者の抗体で得られた遺伝子は *MEA 2* の断片であった。この他、HY 抗体に反応する物質は精子の表面、8 細胞期以降の雄胚表面、MIS (抗ミューラー管ホルモン) があげられる。細胞性免疫系で検出される HY 抗原は Y 染色体上の遺伝子産物 (おそらく精子形成関連) 由来のペプチドであり、HY 抗体と反応する SDM (Serologically detectable male antigen) とは別ものらしい。SDM は常染色体由来の精巣形成、精子形成に関わる遺伝子産物らしい。自己免疫疾患は女性に圧倒的に多い。SDM が通常発現してはならない雌で発現すると、自己免疫疾患の引き金を引く可能性がある。X 染色体を 2 本もち遺伝子量の補正を行わねばならず、不必要な精巣形成、精子形成などの遺伝子を背負われ、雌の負担は受精時から大きい。遺伝子制御の複雑さが、雌が雄より少なく産まれる機構の一因と考えている。

3. Y 染色体を欠失したトゲネズミと Y 染色体遺伝子の蟄居仮説

ウシの精巣誘導遺伝子 *SRY* をクローニングし、マッピングしたところ Y 染色体長腕の末端に位置していた。ヤギ、ヒツジでも同じであった。アマミトゲネズミ (25, X) およびトクノシマトゲネズミ (45, X) では核型が雌雄同型で、Y 染色体が欠失し、*SRY* は検出できなかった。両者とも他の哺乳類の Y 上の遺伝子 *ZFY* や *TSPY* は X 染色体の末端に転座していた。卵子から X を受け継いだ胚は雌に、精子から X を受け継いだ胚は雄になるのではないかと考えている。概して Y 染色体は矮小化し、遺伝子は両端に移動する傾向にある。Y 染色体はやがてトゲネズミのように、消失するのであろう。私はこれを Y 染色体遺伝子の蟄居仮説とよんでいる。

4. siRNA を利用したウシプリオン遺伝子の鎮静化
ウシプリオン遺伝子に対する siRNA 発現プラスミドベクターを構築し、EGFP を指標として、ウシ肺細胞に安定的に導入した。核移植により胚盤胞を作り、胚移植により仔牛を得た。これは緑色蛍光を発する。現在、鎮静化の状況を解析中である。

特別講演 3

糖尿病性壊疽に対するマゴットセラピーの可能性

三井 秀也

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

心臓血管外科 講師

マゴットセラピーとは、クロバエ科の 1 種のヒロズキンバエ (*Phaenicia (Luciria) sericate*) のウジ虫

