

# 第 16 回 LEC ラット研究会大会

プログラム

抄録集

日時：平成 18 年 5 月 10 日（水）

会場：神戸国際会議場 505 会議室

（第 53 回日本実験動物学会共催）

大会ホームページ

<http://www13.ocn.ne.jp/pathol2/>

大会長

泉 啓介

（徳島大学大学院 HBS 研究部環境病理学分野）

## <参加者の皆様へ>

### 会場

神戸国際会議場 505 会議室  
〒650-0046 神戸市中央区港島中町 6-9-1  
電話：078-302-5200 FAX:078-302-6485

### 会期

平成 18 年 5 月 10 日（水）11：00-16：00

### 参加受付

神戸国際会議場 505 会議室前で午前 10 時から受付を開始致します。

参加費：一般 3,000 円, 学生 2,000 円  
懇親会費：5,000 円（午前中で締め切ります）

注意）第 53 回実験動物学会総会に登録された方は参加費が無料になりますが、LEC ラット研究会の登録では実験動物学会総会には参加できません。

## <座長、演者の方へ>

### 発表者の方へ

発表時間：発表 15 分 討論 10 分  
PowerPoint 2003 の入った Windows XP のパソコンを用意いたします。特殊なフォント、動画を使用する場合や、Macintosh を使いたい方はパソコンをご用意下さい。なお、事前に USB メモリーでお持ちいただいたデータの動作確認を行ってください。

### 座長の方へ

進行は座長の先生にお任せします。活発な討論となりますようお願い致します。

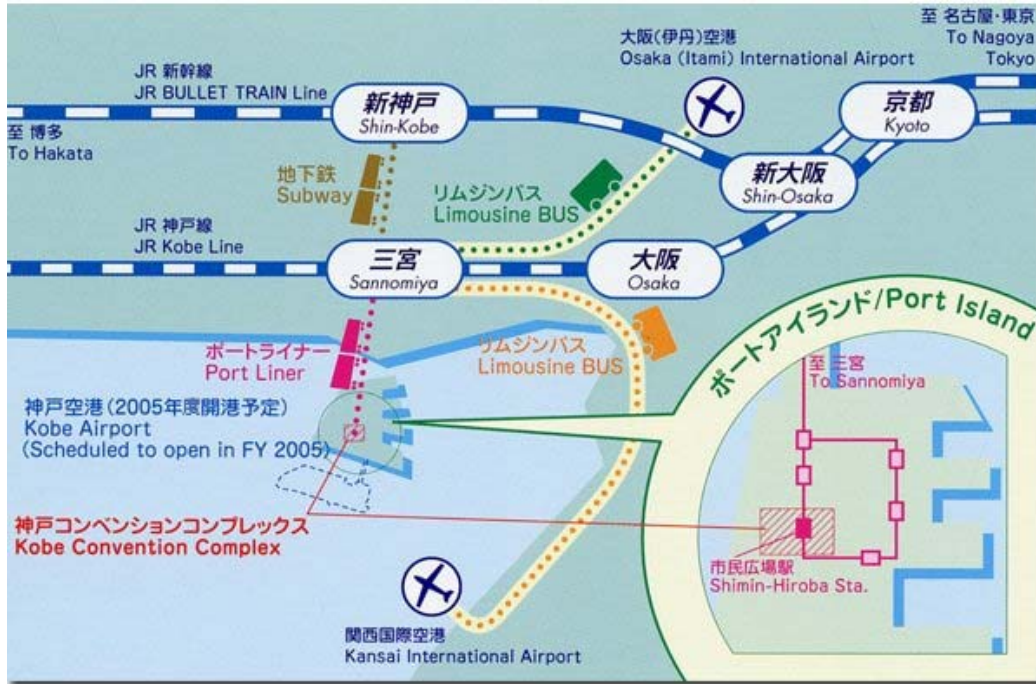
## <運営委員会・モニタリング委員会のご案内>

午前のセッションが終わり次第、504 会議室で行います。昼食は大会事務局で用意致します。

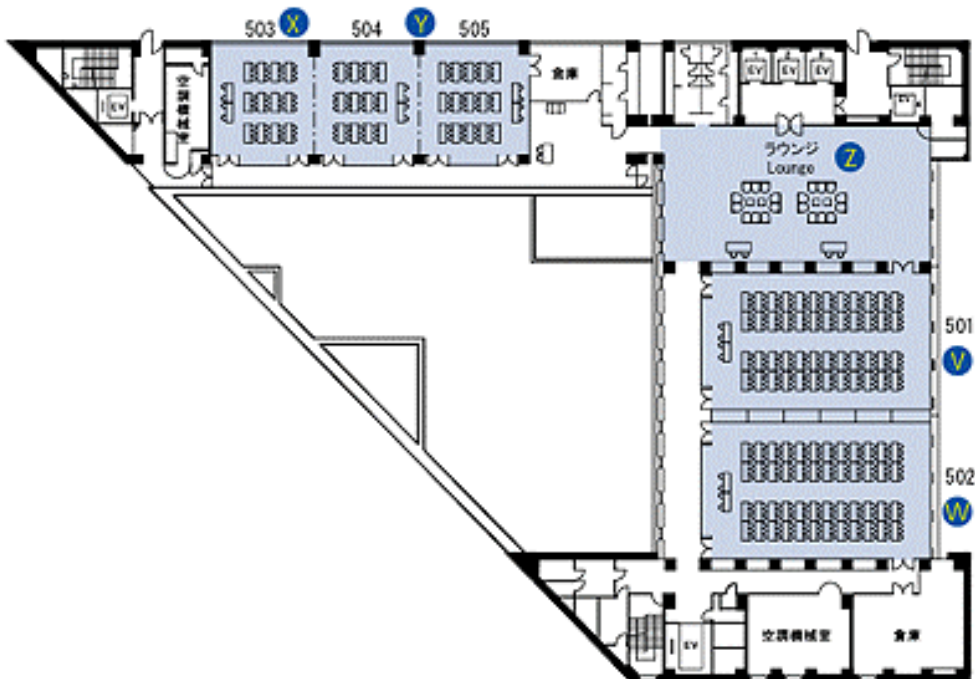
### 大会事務局

〒770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15  
徳島大学大学院 HBS 研究部 環境病理学分野内  
上原久典 (uehara@basic.med.tokushima-u.ac.jp)  
Phone:088-633-7066 Fax:088-633-7067

## <会場へのアクセス>



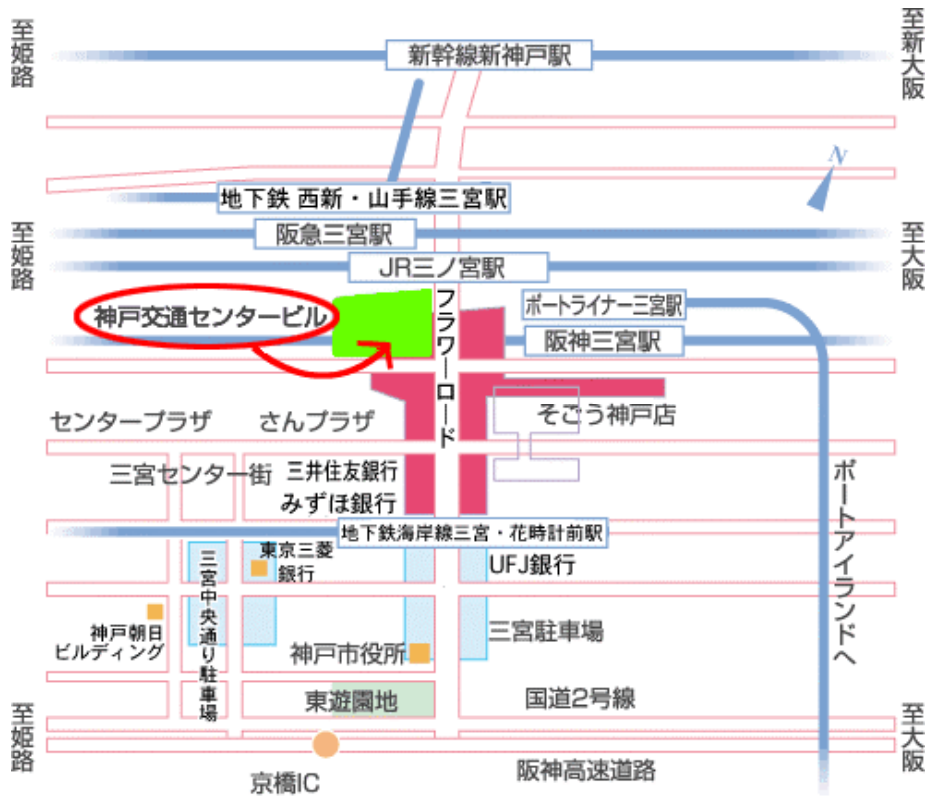
- J R 三ノ宮駅からポートライナー（市民広場駅下車）で 10 分
- J R 新神戸駅から地下鉄（三宮駅乗り換え）ポートライナーで 20 分
- 神戸空港からポートライナー（市民広場駅下車）で 8 分
- 関西国際空港からリムジンバス（三宮乗り換え）ポートライナーで 80 分
- 大阪(伊丹)国際空港からリムジンバス（三宮乗り換え）ポートライナーで 55 分



## <懇親会のご案内>

5月10日17時から三宮の燦 SUN（神戸交通センタービル10階 電話078-331-1233）にて行います。

会費は5,000円です。受付時に参加費と一緒に支払い下さい。申込は午前中で締め切ります。



ポートライナー三宮駅から1階に降りずに徒歩3分  
(santicaと書かれたビルの10階)

プログラム  
(505会議室)

座長：松本耕三先生

11:00-	演題 1 :	活性酸素によるトランスフェリン糖鎖構造の変化 (兵庫医大・江口裕伸ほか)
11:25-	演題 2 :	LECラット脳における銅の蓄積とDNA損傷生成 (酪農大・林 正信ほか)
11:50-	演題 3 :	X線誘発LEAラット糖尿病の発症機構 (徳島大・泉 啓介ほか)

12:20- 運営委員会・モニタリング委員会 (504会議室)

座長：安居院高志先生

13:40-	演題 4 :	細胞移植モデルとしてのLECラットの役割 (熊本大・中村公俊ほか)
14:05-	演題 5 :	LECラット, LEAラットの化学発がんおよびX線発がん 感受性 (徳島大・高橋徹行ほか)

座長：林 正信先生

14:30-	演題 6 :	LECラットに発生する炎症性腸疾患の解析 (徳島大・石丸直澄ほか)
14:55-	演題 7 :	LECラット <i>Atb7b</i> 遺伝子欠失領域の同定 (北大・坪松耕太ほか)

15:20- コーヒーブレイク

座長：笠井憲雪先生

15:40-	演題 8 :	Genotype-drivenコンジェニックラットによる放射線 高感受性遺伝子座のマッピング (北大・安居院高志ほか)
16:05-	演題 9 :	LECラットの放射線感受性遺伝子の同定の試み (放医研・須堯綾ほか)

17:20-19:20 懇親会 (三宮の燦)

## 1. 活性酸素によるトランスフェリン糖鎖構造の変化

○江口裕伸、藤原範子、大河原知水、安田潤、吉原大作、鈴木敬一郎  
兵庫医科大学・生化学講座

【目的】LEC ラットは肝臓への過剰な銅の蓄積により、肝炎および肝ガンを自然発症する。急性肝炎期には銅イオンによる酸化ストレスが増加していることから、肝炎の発症や症状の悪化に活性酸素が関与していることが考えられる。我々はこれまでに、活性酸素が N 型糖鎖を切断することを見出した。また、以前に本研究会にて、急性肝炎期に LEC ラットの血清タンパク質の糖鎖構造が変化していることを報告した。今回、急性肝炎期における糖鎖構造の変化について HPLC 法により解析した結果を報告する。

【方法】LEC ラット血清からトランスフェリンを精製し、さらに N-グリコシダーゼ F にて糖鎖を分離した。この糖鎖は精製後、2-アミノピリジンにて蛍光標識し、イオン交換カラムおよび逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー、および質量分析法による解析に用いた。糖鎖構造の比較のため、肝炎期の LEC ラットとペニシラミン投与により肝炎発症を予防した同週令の LEC ラットを用いた。

【結果】ペニシラミン投与した LEC ラット血清トランスフェリンの糖鎖構造は、3つのシアル酸をもつトリシアロ糖鎖が主な糖鎖構造であったのに対し、急性肝炎期には2つのシアル酸をもつジシアロ糖鎖と、シアル酸およびガラクトースが欠失したアシアロアガラクト糖鎖が増加していた。また、ペニシラミン投与ラットのトランスフェリンを銅/過酸化水素処理して糖鎖構造解析したところ、急性肝炎期と同じ糖鎖構造が認められた。

【考察】今回の結果は、生体内で生じた活性酸素が糖鎖構造を変化させることを明らかにした初めての報告である。トランスフェリンは鉄代謝に関わっていることより、活性酸素による糖鎖構造の変化が、LEC ラットにおいて見られる鉄代謝機能の異常に関与している可能性が考えられる。また、シアル酸のカルボキシル基には糖ラジカルが生じやすいことが報告されており、今後活性酸素によるシアル酸の切断機序についても検討していく予定である。

## 2. LEC ラット脳における銅の蓄積と DNA 損傷生成

○林 正信、布施清夏、遠藤大二、中山憲二<sup>1)</sup>、奥井登代<sup>1)</sup>  
酪農大・獣医・放射線、<sup>1)</sup>北海道衛研

【目的】ヒトウイルソン病では脳への銅蓄積によって中枢神経症状が発症すると考えられており、frontal cortex では肝臓と同程度の銅が蓄積することが報告されている。LEC ラットの脳では若い週齢で対照ラットよりも銅濃度はやや低く、その後 20 週齢で有意に銅含量は増加することが示されているが、量的には少なく、また、銅の蓄積によって生成される活性酸素を介する DNA 損傷の生成などについても明らかとなっていない点が多い。本研究では LEC ラット脳における銅濃度の推移と DNA 損傷の生成について解析した。

【材料と方法】LEC ラットならびに対照の WKAH ラットにおける脳、肝臓、腎臓における銅、鉄、亜鉛、モリブデンの濃度を原子吸光光度計で測定した。各週齢での大脳と小脳細胞における DNA 損傷の程度はコメット法で解析した。

【結果と考察】WKAH ラット大脳、小脳、脳幹では 4~26 週齢で銅濃度の有意な変化は見られず、また、4~18 週齢では LEC と WKAH ラット脳の間には銅濃度に有意差は見られなかった。LEC ラット大脳、小脳、脳幹で 20~24 週齢で銅濃度は 4 週齢と比較して顕著に増加し、24 週齢で WKAH ラット脳の銅濃度の 3.5~6 倍高い値を示した。しかしながら、LEC ラット脳の銅濃度は肝臓、腎臓と比べると 1/20 以下と少なく、また、最大の銅濃度が見られる週齢も肝臓での 13 週齢前後、腎臓での 15~18 週齢と比べて遅いことが示された。LEC ラット肝臓における銅濃度は 16~20 週齢で一旦減少し、次いで 22~24 週齢で再び増加した。LEC ラット脳の鉄、亜鉛、モリブデンの濃度は WKAH ラット脳と差はみられず、週齢に伴う有意な変化もみられなかった。DNA 損傷の程度はコメット像において DNA 損傷を有しない細胞の割合とコメットスコアを用いて解析した。WKAH ラット脳細胞では 4~24 週齢で両指標ともに週齢による変化はみられなかった。また、4~20 週齢では両指標共に LEC と WKAH ラット脳の間で有意差は見られなかった。しかしながら、LEC ラット大脳、小脳細胞では 24 週齢で DNA 損傷を有しない細胞の割合は有意に減少し、DNA 切断頻度の指標であるコメットスコアも増加した。これらの結果は LEC ラットでは急性肝障害によって肝臓に多量に蓄積されていた銅が血中に遊離して脳に移行するが、蓄積の時期は腎臓に比べて遅いことや蓄積の程度は小さいことを示した。一方、LEC ラット脳細胞では肝臓や腎臓に比べて低い銅濃度で DNA 損傷が生じることが示され、脳は酸化ストレスに対して高感受性の組織と考えられていることから、低濃度の銅によって中枢神経に障害が生じることが示唆された。

### 3. X線誘発 LEA ラット糖尿病の発症機構

○泉 啓介，瀧下英子，松本耕三

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部環境病理，同動物実験施設

【目的】近交系 Long-Evans Agouti (LEA) ラットは長期飼育すると糖尿病が自然発症する。我々は LEA ラットに X 線を全身照射すると早期に糖尿病が発症した。そこで，局所遮蔽実験を行い，X 線誘発糖尿病の発症機構を検討した（実験 1）。次に Quantitative trait loci (QTL) 解析によって X 線誘発糖尿病の責任遺伝子座を検索した（実験 2）。

【方法】実験 1：雄 LEA ラットに 6 および 8 週齢にそれぞれ 2 Gy（計 4 Gy）の X 線全身照射を行い，12 週齢で 2 g/kg ブドウ糖負荷試験を行うモデルを用いた。実験 2：138 匹の雄 (F344xLEA) xLEA バッククロスラットを作製した。X 線照射による糖尿病の Bioassay system として，6 週齢および 8 週齢にそれぞれ 2 Gy の X 線全身照射を行い 12 週齢および 18 週齢で 2 g/kg 糖負荷試験を行う方法を用いた。糖負荷後 30 分の血糖値を表現型とした。予め採取し凍結保存しておいた尾から DNA を抽出し，149 のマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型を決定し，QTL 解析を行った。

【結果と考察】実験 1：6 週齢雄ラット (n=9) を用いて，膵臓部，大腿骨，胸腺部を鉛板で 3 cm 幅で遮蔽して計 4 Gy の X 線照射を行ったところ，膵臓部，胸腺部遮蔽では糖尿病発症を回避できたが ( $P < 0.05$ )，大腿骨遮蔽では 3/8 (38%) が糖尿病 ( $> 250$  mg/dl) を発症し，全身照射コントロールの 4/8 (50%) と変わらなかった。実験 2：バッククロスラットでは X 線誘発糖尿病感受性遺伝子座の 1 つは第 20 番染色体上の D20W0X3 (20p12) 近傍にマップされた (LOD score=4.1)。なお，(F344xLEA)F1 ラットには高血糖はみられなかった。20p12 は MHC 遺伝子領域であり，LEA ラットの糖尿病は 1 型糖尿病モデルである NOD マウス，BB ラットなどと類似していることが示唆された。



#### 4. 細胞移植モデルとしての LEC ラットの役割

○中村公俊<sup>1</sup>、服部希世子<sup>1</sup>、松本志郎<sup>1</sup>、田中靖彦<sup>1</sup>、佐藤歩<sup>1</sup>、久富雄一朗<sup>1</sup>、  
奥村健治<sup>1</sup>、松本耕三<sup>3</sup>、山本哲郎<sup>2</sup>、遠藤文夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 熊本大学大学院医学薬学研究部小児科学分野、<sup>2</sup> 分子病理学、<sup>3</sup> 徳島大学医学部附属動物実験施設

##### 【はじめに】

難治性の肝不全に対し、根治療法として肝移植が行われているが、その実施には倫理的、社会的問題が多い。それに代わる治療法として細胞移植が考えられる。われわれは唾液腺由来多分化能細胞 (SGP) を分離し、SGP 細胞を用いた細胞移植後の分化、増殖について検討した。一方、造血細胞移植により移植されたドナー由来細胞は、肝臓において分化増殖し、肝細胞として機能することが知られてきた。そこでウイルソン病のモデル動物である LEC ラットを用いて造血細胞移植を行った。そしてドナー由来細胞の肝臓における分化増殖を解析し、対象疾患の根治を目的とした肝障害治療を試みた。

##### 【方法】

LEA ラットの唾液腺を分散、消化後に SGP 細胞を分離した。この細胞は分化誘導後に肝細胞、腓ラ氏島細胞などの細胞マーカーを発現していることが明らかになった。この SGP 細胞を GFP ラベルした後に LEC ラット脾臓内に移植し、ドナー由来細胞の局在を評価した。一方、オス LEA ラット由来骨髓細胞を用いてメス LEC ラットへ骨髓移植を行ない、ドナー由来細胞の解析を行った。ドナー由来細胞の同定は、Sry 遺伝子断片をプローブとした *in situ* hybridization 法により行ない、さらに肝細胞をアルブミン組織染色を用いて検出した。

##### 【結果と考察】

SGP 細胞を移植した肝臓には、ドナー由来細胞が結節を作っていることが確認された。この移植細胞はアルブミンを産生していた。この SGP 細胞は肝不全を伴う代謝性疾患や糖尿病などの細胞移植治療に有用であると考えられた。また、骨髓移植を受けた LEC ラットの肝臓に、ドナー由来とされる Sry 陽性細胞が確認された。アルブミン組織染色により、この細胞はアルブミンを産生する肝細胞であることが確認された。Sry 陽性細胞は、肝細胞、胆管上皮細胞のいずれにも分化していることが確認された。このほかに、Sry 陽性細胞は血管内皮細胞、血液細胞からも検出された。移植後の肝臓では銅蓄積、セルロプラスミンの産生といった銅代謝が改善していた。このことは骨髓移植が肝移植や遺伝子治療とともに肝障害を来す疾患の治療に応用できる可能性を示している。LEC ラットは肝臓を標的とした細胞移植モデルとして有用である。

## 5. LEC ラット, LEA ラットの化学発がんおよびX線発がん感受性

○高橋徹行, 泉 啓介

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部環境病理学分野

【目的】これまで種々の化学発がん物質やX線に対するLEC, LEA, F344 ラットの発がん感受性の差とその機構について報告してきた。これらをまとめて発がん感受性から見たLECラットの特徴について述べる。

【方法】近交系ラットとしてLEC, LEA, F344, WKAHラットを, コンジェニックラットとしてWKAH. *C-Atp7b*ラットを用いた(いずれも雄)。肝を標的として*N*-diethylnitrosamine (DEN)皮下注射を, 腸を標的として*N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU)とazoxymethane (AOM)皮下注射を, 肺を標的として*N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP)経口投与を, 膀胱を標的として*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)経口投与を, 神経系を標的として*N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU)経胎盤投与を行った。X線全身照射による発がん感受性を比較した。

【結果と考察】LECラットはDEN誘発肝発がん高感受性であり, これはWKAH, WKAH. *C-Atp7b*ラットと比較した実験から*Atp7b*遺伝子の変異のみでほぼ説明できた。LECラットはMNU, AOM誘発大腸発がん高感受性であり, 免疫不全に伴う発がん物質投与時期の盲腸・結腸炎の役割が重要と考えられた。LECラットはDEN, MNU, BHP誘発肺発がん低感受性であり, 肝の $O^6$ -methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT)高値が一因と考えられた。LECラットはBBN誘発膀胱発がん低感受性であり, キレート剤であるD-penicillamine投与による発がん率上昇から, 尿中に排泄される銅の発がん抑制作用が考えられた。LECラットはENU誘発神経系発がん低感受性であり, MGMT高値がその一因と考えられた。LECラットはX線誘発肺発がんおよび軟部・骨発がん抵抗性, 大腸発がん感受性であり, 化学発がん感受性とよく似た傾向を示した。いずれの発がん物質に対してもLEAラットはF344ラットと似た傾向を示した。以上の結果からLECラットは肝, 大腸を除くと発がん抵抗性であることが明らかになった。

## 6. LEC ラットに発生する炎症性腸疾患の解析

○石丸直澄<sup>1</sup>、泉啓介<sup>2</sup>、林良夫<sup>1</sup>

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔分子病態学分野<sup>1</sup>、同環境病理学分野<sup>2</sup>

【目的】LEC ラットの胸腺での T 細胞分化異常及び末梢での T 細胞の機能異常については知られているが、免疫疾患との関わりは不明である。本研究では LEC ラットに自然発症する炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease: IBD) 様の病変を解析し、その発症機序について免疫学的検討を行った。

【材料及び方法】4 週齢から 12 週齢における LEC ラットの全身臓器について病理組織学的解析を行った。対照ラットとして LEA ラットを用いた。胸腺、脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板、腸上皮内における T 細胞分画に関してフローサイトメーター及び免疫染色を用いて解析した。さらに、LEC ラットの末梢 T 細胞のサイトカインの産生、各種刺激による細胞増殖反応、GATA-3, T-bet, NF- $\kappa$ B などのサイトカイン調節性転写因子についてウエスタンブロットにて検討し、腸病変局所における T 細胞の動態を共焦点顕微鏡にて観察した。さらに、LEC ラットの T 細胞を SCID マウスに移入することにより LEC ラットの炎症性腸病変を再現できるか否かを検討した。

【結果及び考察】LEC ラットの大腸に 6 週齢より潰瘍を伴う炎症性病変が高頻度に観察され、浸潤炎症性細胞は CD4 陽性 T 細胞、マクロファージが主体であることが判明した。LEC ラットでは胸腺及び末梢において調節性 T 細胞である CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞が対照ラットに比較して有意に減少しており、腸間膜リンパ節の T 細胞では T-bet の発現亢進を介した Th1 型へのサイトカイン産生のシフトが観察された。また、LEC ラットの腸間膜リンパ節の T 細胞の移入により、SCID マウスに LEC ラットの腸病変を再現できた。LEC ラットは中枢性及び末梢トレランスの維持機構の異常に基づいたヒト IBD の新たな疾患モデルとし極めて有用であることが明らかとなった。

## 7. LEC ラット *Atp7b* 遺伝子欠失領域の同定

○坪松耕太、浅野 淳、佐々木宣哉、安居院高志  
北大院・獣医・実験動物

【目的】 LEC ラットはヒトウイルソン病のモデル動物で、*Atp7b* 遺伝子を欠損している。*Atp7b* 遺伝子の変異については 3' 側に大きな欠失があることが予想されているが、これまで欠失領域を正確に同定した報告はない。本研究では LEC ラットゲノム上の *Atp7b* 遺伝子の欠失領域を正確に同定すると共に、*Atp7b* 遺伝子近傍に一緒に欠失している遺伝子が存在するか否かを明らかにすることを目的とした。

【方法】 LEC および BN ラットの尾よりゲノム DNA を調製し、種々のプライマーを用いて PCR および PCR 産物の塩基配列解析を行うことにより欠失領域の同定を行った。また、近傍の遺伝子または EST の発現解析には、様々な臓器から RNA を調製し、RT-PCR を行うことでその発現について解析した。

【結果】 NCBI ラットゲノムデータベースより *Atp7b* 遺伝子の下流 (3' 側) に *LOC498675* という遺伝子が存在し、正常ラットでは精巣でのみ発現していることが判明した。そこで *LOC498675* 特異的プライマーを合成し、BN および LEC ラット精巣での発現を調べた結果、*LOC498675* は両ラット精巣において正常に発現していることが明らかとなった。そこで欠失領域のおよその見当をつけるため *Atp7b* 遺伝子エクソン 14 と *LOC498675* 間で 4 ヶ所の領域を設定し、それぞれを増幅するプライマーを用いてゲノム PCR を行った。その結果 LEC ラットの欠失領域は *Atp7b* 遺伝子イントロン 15 から下流にかけて約 16 kb の範囲にあることが推定された。次にその欠失領域の両端に位置するプライマーを用いてゲノム PCR を行ったところ、LEC ラットでは約 3 kb の PCR 産物が検出されたのに対し、BN ラットでは検出されなかった。LEC ラットで検出された PCR 産物の塩基配列を解析したところ、イントロン 15 の 2,107 番目の塩基から下流に約 13 kb の欠失領域が存在することが明らかとなった。この結果を受けて、この欠失領域の両端と欠失領域内に位置する計 3 つのプライマーを設計しゲノム PCR を行うことにより、LEC ラットアレルの容易なジェノタイピングが可能となった。また、欠損領域の塩基配列について BLAST 検索を行ったところ、*Atp7b* 遺伝子下流約 5 kb 内に EST が 3 つ存在していることが明らかとなった。

【考察】今回我々は LEC ラット *Atp7b* 遺伝子の欠失領域を完全に決定することに成功した。我々が本研究を遂行している途上で同様の結果が報告された (S. Ahmed *et al.* Mol. Brain Res., 137, 63, 2005)。両研究室において決定された欠失領域は全く同一であった。現在 *Atp7b* 遺伝子下流に存在する 3 つの EST の発現について LEC および BN ラットを用いて解析を行っている。

## 8. Genotype-driven コンジェニックラットによる放射線高感受性遺伝子座のマッピング

増田和彦<sup>1</sup>、山内豪人<sup>2</sup>、今尾武士<sup>2</sup>、宮本智美<sup>1</sup>、三好一郎<sup>1</sup>、松本耕三<sup>3</sup>、浅野淳<sup>2</sup>、佐々木宣哉<sup>2</sup>、○安居院高志<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>名市大院・医・実験動物研究教育センター、<sup>2</sup>北大院・獣・実験動物、<sup>3</sup>徳島大院・ヘルスバイオサイエンス研究部・動物実験施設

【目的】LEC 及び LEA ラットは放射線高感受性であることが知られている。BN ラットとのバッククロス (BC) を用いた遺伝解析から、遺伝様式は劣性でポリジェニックであることが明らかにされた。更にマイクロサテライト (MS) マーカーを用いた quantitative trait loci (QTL) 解析から、主要な QTL (*xhs1*) が第 4 染色体上に存在することが明らかにされた (T. Agui et al. Mamm. Genome 11, 862, 2000)。LEC ラットの放射線高感受性が X 線照射後の DNA 二重鎖切断修復 (DSB) の異常に起因することが示唆されていることから、*xhs1* 遺伝子座の責任遺伝子は DSB 修復に関与する新規の遺伝子であることが推測される。本研究では *xhs1* 責任遺伝子を明らかにするために、まず複数のコンジェニック (Con) ラインを作製し、その表現型を解析することで *xhs1* 遺伝子座の存在領域を狭めることを試みた。

【方法】Con ラットの作製はスピードコンジェニックの手法を用いて行った。ジェノタイピングには LEC ラットと BN ラット間で多型の見いだされた 32 種の MS マーカーを用いた。*xhs1* LEC 及び BN アレルのタイピングには以前の報告 (T. Agui et al. Mamm. Genome 11, 862, 2000) において *xhs1* QTL ピークであった *D4Rat49* と *D4Rat182* を用いた。LEC バックグランド (BG) Con ラットの作製は (LEC x BN)F<sub>1</sub> ♀ に LEC ♂ を BC した。N6 で *D4Rat49* および *D4Rat182* 以外のマーカーが全て LEC ホモであるラインが数系統得られた。そこで第 4 染色体の MS マーカーを 32 種に増やし、兄妹交配を 6-8 世代繰り返すことにより、最終的に第 4 染色体 *xhs1* 近傍が様々な領域で BN ホモになった LEC-BG Con を 2 系統作製することができた。BN-BG Con については (LEC x BN)F<sub>1</sub> ♀ に BN ♂ を BC し、ほぼ同様の方法により *xhs1* 近傍が様々な領域で LEC アレルホモになったものを最終的に 4 系統作製することができた。これらの Con 系統に X 線を照射し、衰弱状態になるまでの時間を計測し表現型とした。これらのデータを最新の NCBI ラットゲノムデータベースと照らし合わせることで *xhs1* のマッピングを行った。

【結果および考察】*xhs1* は *D4Mit32* (117, 909, 298) - *Au049897* (124, 612, 099) 間にマップできた。最近他のグループによって LEC ラットと F344 ラットから作製した phenotype-driven Con 系統を用いて Radiation susceptibility gene が *D4Got85* (121, 568, 467) - *D4Got148* (122, 795, 292) 間にマップされた (A. B. Tsuji et al. Genomics, 86, 271, 2005)。両研究グループによって独自に同定された放射線高感受性責任遺伝子座存在領域は重複しており、*xhs1* 責任遺伝子がこの領域に確かに存在していることが示唆された。

## 9. LECラットの放射線感受性遺伝子の同定の試み

○須堯綾、須藤仁美、相良雅史、辻厚至、佐賀恒夫、原田良信

放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター分子病態イメージンググループ

ウィルソン病のモデルである LEC ラットは肝炎および肝ガンを発現するラットである。また X 線を照射すると、腸死、骨髄死、および損傷した DNA の修復異常などを示す放射線感受性動物モデルである。放射線感受性には DNA 修復の遺伝子が関与していると考えられているが、その遺伝子はまだ同定されていない。この遺伝子を同定することで、新たな DNA 修復機構や発がん機構を明らかにすることにつながると考えられる。

我々はこれまでに LEC ラットの放射線感受性遺伝子を同定するために、F344 ラットをバックグラウンドとし、LEC ラットの染色体の断片を導入したコンジュニック系統の作成を行った。各戻し交配世代ラットの中から感受性遺伝子が導入された個体を選別するために、各世代のラットを LEC ラットと交配し、得られた仔に 4.5Gy の X 線を照射し、30 日以内に約半数の仔が死亡した親を遺伝子キャリアーラットと判定し、次の戻し交配に用いた。同時にゲノムの遺伝子解析も行い感受性遺伝子がラットの 4 番染色体の特定の領域にあることを明らかにした。この放射線感受性遺伝子の領域の詳細な Radiation Hybrid Map を作成した。この Map を元にこの領域すべてをカバーする BAC のコンティグを構築した。これら BAC 中には LEC ラット由来細胞に導入すると生存率や DNA 修復が正常レベルに戻る BAC クローン(200kb)があることを明らかにした。正常ラットと LEC ラットでこの BAC クローンの領域の比較を行ったが既知の翻訳遺伝子の配列や発現量には差がなかった。しかし、この領域のある EST が正常ラット由来細胞では発現しているが LEC ラット由来細胞ではほとんど発現していないことを明らかにした。今後はこの遺伝子の全長をクローニングし、新規放射線感受性遺伝子を同定し、この遺伝子の発現解析と機能解析を行う予定である。