

平成21年 4月 24日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590336

研究課題名（和文） インターフェロン調節因子6の機能解析とモデルマウスの解析

研究課題名（英文） Functional study of *Interferon Regulatory Factor 6*

研究代表者

近藤 新二 (KONDO SHINJI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90398149

研究成果の概要：

本研究はマウスや細胞を使って、インターフェロン調節因子6遺伝子（IRF6）の機能を解析することを目的にした。具体的には IRF6 遺伝子を改変したマウスの作製を行ったり、あるいは遺伝子変異を人工的に IRF6 に導入し細胞に感染させた場合この遺伝子の働きが減ることなどを発見した。研究代表者は IRF6 の異常がヒトでは口唇口蓋裂を引き起こすことを発見しており、この遺伝子を研究することはそれらの疾患の発症予防に役立つと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：遺伝医学・分子遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：遺伝子，ゲノム，口唇口蓋裂，IRF6

## 1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は日本では500人に1人の割合で発症する頻度の高い先天奇形で、先天異常疾患のなかで重要な位置を占めるものの一つである。申請者は長年ヒトの疾患の原因遺伝子単離に従事し、そのなかで口唇口蓋裂をきたす疾患であるVan der Woude症候群（VWS）と膝窩翼状片症候群（PPS）の二つの疾患がIRF6の変異によって起こることを発見した。次いで申請者らは伝達不平衡テストなどを使い、IRF6が非症候群性口唇口蓋裂の発症にも関与することを明らかにした。またIRF6がMaspinと呼ばれるタン

パク質と結合することを発見した。さらに最近申請者らは、IRF6遺伝子ノックアウトマウスを作製、解析することにより、IRF6が皮膚の発生にも重要な働きをもつことを報告した。

これらの結果はIRF6が口唇口蓋の発生のみならず皮膚の発生の鍵をにぎる重要な遺伝子であることを示しており、その機能を解明することは口唇口蓋裂の発症機序、皮膚や口蓋の形成メカニズムに新たな知見をもたらすものと考え本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の当初の目的は口唇口蓋裂のモデル

としてVan der Woude症候群 (VWS) に注目し、その原因遺伝子である Interferon regulatory factor 6 遺伝子 (IRF6) の機能を解析することであった。具体的には以下のことを明らかにすることを目的とした。

- (1) 正常および異常IRF6遺伝子、あるいはレポーター遺伝子導入による遺伝子改変 (トランスジェニック) マウスの作成
- (2) 作成したモデルマウスの解剖学的、免疫組織化学的解析と発現解析
- (3) IRF6の標的遺伝子および結合パートナーの発見によるシグナル経路の解明

### 3. 研究の方法

#### (1) トランスジェニックマウスの作成

正常および異常IRF6遺伝子、あるいはレポーター遺伝子を導入した遺伝子改変 (トランスジェニック) マウスを受精卵の前核へのマイクロインジェクションにより作製する。

(2) yeast two hybrid 法による IRF 6 結合タンパクの単離

IRF 6 の各領域をもつベクターを作成する。これらを用い様々なヒトやマウスの cDNA ライブラリーを対象にスクリーニングを行い結合タンパク質を同定する。

#### (3) IRF 6 遺伝子の機能解析

培養細胞を使用したルシフェラーゼアッセイにより、遺伝子変異が転写活性化機能に与える影響を評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) トランスジェニックマウスの作成

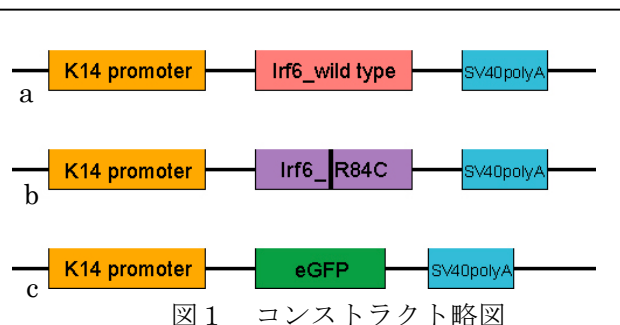
##### ① コンストラクトの作製

K14-*Irf6\_wild type* cDNA トランスジェニックマウス用コンストラクト：現在 *IRF6* のプロモータは分かっていないが *IRF6* はケラチン 14 (K14) と類似の発現パターンを示し、口蓋癒合部、皮膚で発現することが分かっている。そこで K14 プロモータを利用して *IRF6* を発現させ上皮細胞における *IRF6* の役割りを明らかにすることができると考えそのた

めのコンストラクトを作成した。(図 1a)

K14-*Irf6\_R84C* cDNA トランスジェニックマウス用コンストラクト：R84C 変異は膝窩翼状片症候群 (PPS) に特異的に見られる変異で、我々は PPS 発症機序として優性ネガティブ効果を考えているので *IRF6* に病的変異 (R84C) を導入したマウスを作成すればこの仮説の検証を行うことができると考えそのためのコンストラクトを作製した。(図 1b)

K14-eGFP トランスジェニックマウス用コンストラクト：前述のごとく K14 は *IRF6* も発現している口蓋癒合部の上皮で発現するので、その細胞を eGFP でラベルし特異的に回収すれば、これらの細胞を使い *IRF6* にとって生理的な条件に近い状態での解析を行うことが出来るようになる。この目的のためのマウ



ス用コンストラクトを作製した。(図 1c)

PAC トランスジェニックマウス用コンストラクトの作成：ヒト *IRF6* 改変 PAC クローンを利用し、ヒト *IRF6*-eGFP 融合遺伝子を持つトランスジェニックマウスの系を樹立すれば *IRF6* 本来のプロモータを使用することになるのでより詳細な発現解析を行うことが出来ると考え、この目的のためのマウス用コンストラクトを作製した。

##### ② 遺伝子改変動物の作製

前核へのマイクロインジェクション法により遺伝子を導入したマウスを作成する技術は確立することができた。同法により得られたマウスの 5%程度にゲノムへの外来遺伝子

の挿入が確認され、交配により生殖細胞への伝達もサザンブロット法などにより確認された。ただ遺伝子の発現はプロモーターなどに依存するようでさらに種々のコンストラクトを作成する必要がある。現在は IRF6 遺伝子を改変したマウスの交配を行い世代と個体数を増やして発現解析をしているところである。またこの改変技術は他の研究者に提供可能で、実際別の遺伝子を用い共同研究を行っている

(2) yeast two hybrid 法による IRF6 結合タンパクの単離

IRF6 の各ドメイン(タンパク結合ドメイン: SMIR/IAD や DNA 結合ドメイン)を持つように設計したベイトベクターを作成し、マウス cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。その結果結合タンパクの可能性のある約 10 種類の遺伝子がピックアップされた。これらはあくまでもスクリーニングの結果なので、現在それらの遺伝子について真の結合タンパクであるかどうかを検討している。これにより IRF6 のシグナル伝達経路が明らかにできれば、口唇口蓋裂の病態解明や皮膚の発生解明に役立つと予想される。

(3) IRF6 遺伝子の機能解析

培養細胞を使用したルシフェラーゼアッセイにより転写活性化機能を測定した。

具体的には患者 DNA で実際に発見した遺伝子変異を Site-directed Mutagenesis を用いて作製し、Gateway® クローニングシステムで発現ベクターに移し替え clone を作製した。これら作製した clone を 293T 細胞に transfection させ、Dual-luciferase assay や  $\beta$ -gal assay を用いて、wild type と mutant の転写活性の比較検討を行った。

その結果 Dual-luciferase Assay では、wild type と比較して、V321M では 4%、G325E では 12%、L345P では 8%、C347F では 2%、F369S

では 9%、C374W では 2%、K388E では 1%、S424L では 4%程度、Fold Activity を低下させていた。Dunnet の t 検定により、V321M、G325E、L345P、C347F、F369S、C374W、K388E、S424L は、いずれも  $p < 0.001$  であり、転写活性を有意に低下させていた。(図 2)

$\beta$ -gal assay でも同様の結果が得られている。

(data not shown)

これらの結果は突然変異が実際に転写活性低下を引き起こしていることを示しており、病気発症につながる証拠となる重要な知見である。

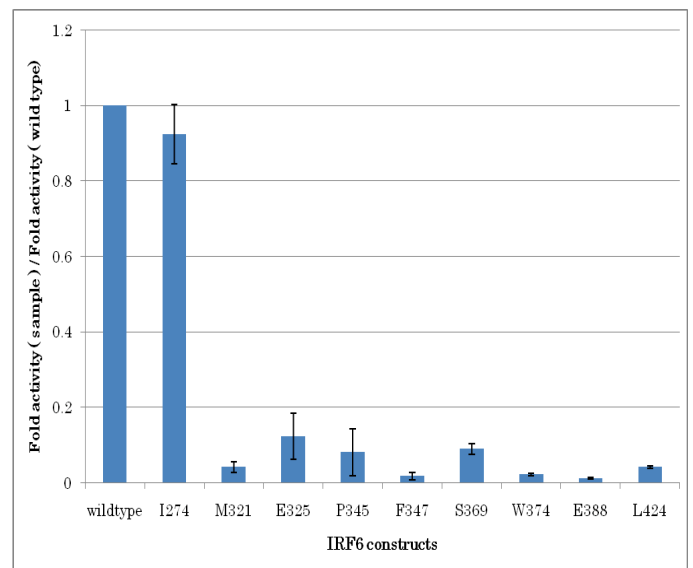


図 2

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Nakashima M, Tsuda M, Kinoshita A, Kishino T, Kondo S, Shimokawa O, Niikawa N, Yoshiura K: Precision of high-throughput single-nucleotide polymorphism genotyping with fingernail DNA: comparison with blood DNA. Clin Chem. 54(10):1746-8, 2008 (査読あり)

② Nakashima M, Nakano M, Hirano A, Kishino T, Kondo S, Miwa N, Niikawa N, Yoshiura K: Genome-wide linkage analysis and mutation analysis of hereditary congenital blepharoptosis in a Japanese family. J Hum Genet. 53(1):34-41, 2008 (査読あり)

③ Sato D, Shimokawa O, Harada N, Olsen OE, Hou JW, Muhlbauer W, Blinkenberg E, Okamoto N, Kinoshita A, Matsumoto N, Kondo S, Kishino T, Miwa N, Ariga T, Niikawa N, Yoshiura K. Congenital arhinia: molecular-genetic analysis of five patients. Am J Med Genet A. 2007 15:143(6):546-5 (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

① 比嘉辰伍 The cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1) gene susceptible to the progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients  
日本薬学会第 129 年会 2008/3/27 京都

② 野口 扶美枝 The hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ) gene susceptible to the clinical progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients  
日本薬学会第 129 年会 2008/3/27 京都

③ Shiota M, Identification of the disease-susceptible gene for Crohn disease in the Japanese population The 2nd Asian Symposium on Pharmaceutical Sciences in Nagasaki 2008/3/17 長崎

④ Takasu M, Correlation between EGFR mutations and the effectiveness of gefitinib in patients with lung adenocarcinoma. 第 58 回アメリカ人類遺伝学会 Nov/13/2008 フィラデルフィア 米国

⑤ Iio N, Identification of the disease gene susceptible to the progression of

primary biliary cirrhosis in Japanese patients 第 58 回アメリカ人類遺伝学会  
Nov/12/2008 フィラデルフィア 米国

[その他]

特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 新二 (KONDO SHINJI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

准教授

研究者番号 : 90398149

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし