

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19592043
 研究課題名（和文） C1qtnf5 遺伝子異常による加齢黄斑変性症モデルの作成と解析
 研究課題名（英文） Production and analysis of the mouse model of age-related macular degeneration with disruption of C1qtnf5
 研究代表者
 亀谷 修平（KAMEYA・SHYUHEI）
 日本医科大学・医学部・講師
 30302269

研究成果の概要：

high fidelity の高い DNA polymerase を用いて PCR cloning 法によりマウス C1qtnf5 遺伝子の cDNA を cloning した。Cloning した cDNA は sequencing にて誤った塩基配列が増幅されていないことが確認された。この cDNA を用いて genomic DNA Library の screening を行ったが、相同組み替えに適切な断片が screening されていない。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：遺伝学、C1qtnf5、Mfrp、加齢黄斑変性症

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は米国を初めとする欧米先進国においてはすでに成人失明原因の第一位であり、我が国においても、増加の一途をたどっている。加齢黄斑変性において網膜色素上皮細胞 (Retinal pigment epithelium: RPE) で特異的に発現する蛋白質の働きが近年注目されてきている。RPE は視細胞外節末端の

貪食を行い視細胞の renewal に関与する他、ビタミン A を貯蔵しロドプシンの合成分解過程に関与、視細胞間基質の生成、脈絡膜から網膜への物質輸送とその逆方向への代謝産物の移動などの働きを持ち、視細胞の機能、形態維持にとって非常に重要な働きをしている。我々は独自に視細胞変性の原因遺伝子であり RPE 特異的発現を示す Mfrp (Kameya et

al. Hum. Mol. Genet. 2002)の同定を報告した。Mfrpはその異常を持つモデルマウスであるrd6マウスの表現型が白点状網膜炎に類似していることから、網膜色素変性症の原因遺伝子の候補と考えられている。この際にMfrpとdicistronic transcriptを形成し、同一のmRNA上に転写されるClqtnf5遺伝子の存在を報告した。このClqtnf5の遺伝子異常により極めて加齢黄斑変性症に類似した病態を示す遺伝性疾患であるLate-onset retinal macular degeneration(L-ORMD)が引き起こされることが報告された(Hayward et al. Hum. Mol. Genet. 2003)。L-ORMDは非常にまれであるが、50才から60才頃にドルーゼンと脈絡膜新生血管を伴う黄斑変性症をきたし、さらに周辺部の網脈絡膜萎縮を伴う疾患である。最近の研究で、Clqtnf5遺伝子の産物であるClqTNFは分泌型の蛋白質であり、Mfrp遺伝子のコードするMFRP蛋白質とin vitroの実験系で結合可能であることが報告された(Shu et al. Hum. Mol. Genet. 2006)。これらの結果は網膜色素変性症と加齢黄斑変性症が一部共通したメカニズムを通して起こりうることを証明するもので、非常に興味深い。

2. 研究の目的

我々はClqtnf5遺伝子異常マウスを作成、解析し、加齢黄斑変性症の成因に関連する分子生物学的役割の解明を試みたいと考えています。

研究期間内にClqtnf5遺伝子異常マウスの作成を行う。作成されたマウスは経時的な病理組織学的解析を行う。マウスであるため発生段階からの組織学的な解析も可能である。またin situ hybridization法を用いた、RPE関連遺伝子の発現の変化の解析を行う。ERGによる電気生理学的な解析を行う。RPE関連

蛋白質および視細胞関連蛋白質に対する抗体を用いた免疫組織化学的な解析を行う。Clqtnf5遺伝子異常マウス単独の解析からも非常にたくさんの有用な知見が得られることが予想されるが、本研究においてさらに興味深い点は、このマウスをrd6マウスと交配させることによって、Clqtnf5遺伝子とMfrp遺伝子の相互作用がin vivoの系として解析、観察可能なことである。

Clqtnf5遺伝子異常マウスはまだ作成されておらず、またClqtnf5遺伝子自然変異マウスも存在しない。すなわちこのマウスの解析から得られる結果はこれまでにない独創的なものとなる。マウスは寿命が約2年と短いため、加齢性の疾患の研究モデルとして特に優れている。MfrpとClqtnf5はdicistronic transcriptを形成する遺伝子群であるため、生体内で相互作用をしている可能性が非常に高いと予想されていたが、前項に示すとおり、その相互作用の一端はin vitroの実験系ですでに証明された。我々の作成したマウスを用いての実験系では、in vivoの実験系での相互作用の解析が可能であり当該研究はこの相互作用、およびこれがどのようなRPE機能に関与しているか、またこれらの視細胞変性、網脈絡膜変性、網膜下脈絡膜血管新生に果たす役割を解明しようとするものである。作成されたマウスは、解析により加齢黄斑変性症のモデルマウスとして適当であると考えられた場合、今後加齢黄斑変性症に対する治療の研究においても重要な位置を占める可能性がある。

3. 研究の方法

Clqtnf5遺伝子異常マウス作成のためClqtnf5のcDNAをクローニングする。従来cDNAのクローニングにはcDNAライブラリーのスクリーニング法が用いられているが、こ

の方法は比較的長時間と労力を要することや、この遺伝子は眼組織特異的な発現であるため眼組織由来の cDNA ライブラリーを作成しなければならない欠点がある。今回我々は PCR を用いたクローニング法を行う。PCR クローニングは以前から簡便に行えることが知られていたが、一方で DNA ポリメラーゼの fidelity の低さによる誤った塩基配列の増幅が問題視されており、比較的長い塩基配列の cDNA クローニングの場合には用い難い欠点があった。近年 high-fidelity の DNA ポリメラーゼがいくつか開発され、それらの中でも KOD-plus-DNA polymerase (TOYOBO) は非常に fidelity が高く比較的長い cDNA のクローニングも可能となった。我々はマウス眼球を摘出後、網膜色素上皮およびこれの付着した網膜組織を分離し、AGPC 法を用いて RNA を抽出する。抽出した RNA から Poly(A)⁺ RNA を精製し、これを用いて first strand cDNA を作成する。この first strand cDNA をテンプレートとして、Mfrp および C1qtnf5 の全長 cDNA を KOD-plus-DNA polymerase で増幅する。この DNA ポリメラーゼで増幅した PCR 産物は平滑末端であるため、ベクターへの挿入効率が通常の DNA ポリメラーゼで増幅した場合より低いことが予想される。挿入効率を上げるため TOPO イソメラーゼ I で活性化した 3'-dT 突出末端を持つ直鎖状のベクターである pCR-Blunt II-TOPO ベクター (invitrogen) を用いる。適切なサイズのインサートをもつプラスミドをミニプレップで確認後、精製し、DNA シークエンシングを行い cDNA に誤った塩基配列がないことを確認する。クローニングした cDNA を制限酵素を用いて切り出し、genomic library のスクリーニングに利用する。得られた genomic DNA 断片をターゲティングベクターにサブクローニングする。ES 細胞 (129Svev) を用いたエレクトロポレーション

後、G418 による薬剤耐性選別を行う。耐性クローンを培養後、一部を PCR スクリーニング用に DNA 分離用とし、マスタープレートをインジェクション用クローンとして凍結保存する。スクリーニング用に分離した DNA を使用して PCR を行う。この際、陽性クローンの検出のため、ターゲティングベクター作成時に挿入した neo 耐性遺伝子をプライマーの一端としてデザインする。陽性クローンに対しては、サザンブロッティング解析を行い確実にターゲティングされていることを確認する。サザンブロッティングにより確認された陽性クローンをブラストシストにインジェクションし、そのブラストシストを代理母マウスに移植する。得られたオスのキメラマウスに対してメスの C57BL/6J マウスと交配を行い F1 ヘテロマウスを取得する。得られた F1 ヘテロマウスのしっぽから DNA を分離しジャームライントランスミッションの確認を PCR スクリーニングにより行う。ジャームライントランスミッション陽性の F1 マウスが得られた場合サザンブロッティング法により確認する。ジャームライントランスミッション陽性が確認された F1 マウスのオスとメスを交配し、C1qtnf5 遺伝子変異マウスを得る。作成された C1qtnf5 遺伝子変異マウスの解析のため、C1qtnf5 遺伝子の転写産物である CTRP5 蛋白質に特異的な抗体を作成する。具体的には CTRP5 の cDNA シークエンスから推測されるアミノ酸配列をもとにペプチド抗体を作成するために適した抗原部位検索を行う。Hoop and Woods の蛋白質の Hydrophilicity / Hydrophobicity plot により、親水性部位を選び、さらに Chou-Fasman の蛋白質の 2 次構造予測結果により、ターン構造を確認し、蛋白質分子表面に存在する部分の推定を行う。この条件を満たすペプチドを作成しこれをアジュバンドとともにウサ

ギに免疫する。数回の免疫後に得られたウサギ血清を、免疫に用いたペプチドを固相化したカラムを用いてアフィニティー精製することにより、より特異的な抗体を作成する。CTRP5 の生体内での局在の検討のため免疫組織学的研究を行い、RPE 内での局在の検討を行う。C1qtnf5 遺伝子異常マウスは局在解析のためのネガティブコントロールとして非常に有用である。C1qtnf5 遺伝子異常マウスと正常コントロールマウスの眼球を摘出し、酢酸/メタノール固定後パラフィン包埋し、マイクロトームで薄切し6ミクロンの切片を作成する。これを抗 Mfrp 抗体または抗CTRP5 抗体を一次抗体として反応させた後、ビオチン結合2次抗体と反応させる。さらにアビジン結合フルオレセインまたはペルオキシダーゼと反応させる ABC 法を用いて反応を増強させる。パラフィン包埋により抗原性が失われる場合にはクライオトームを用いて新鮮凍結切片を作成しこれを用いて同様の反応を行う。得られた試料は共焦点顕微鏡にて観察し、正常コントロールでの両蛋白質の局在、両蛋白質が共通の細胞内局在を示すかどうか、C1qtnf5 遺伝子異常マウスで局在の変化が認められるかなどについて解析する。固定、薄切した標本は *in situ* hybridization 法を用いて、mRNA の発現解析にも用いる。これには C1qtnf5 の cDNA より得られるセンスおよびアンチセンスプローブをハイブリダイゼーションさせ、発現の時期、部位を解析する。免疫組織化学、および *in situ* hybridization 法ともに、非特異的な反応を陽性シグナルと判別することが困難な場合が多いが、今回は C1qtnf5 がノックアウトされたマウスを陰性コントロールとして用いることができるため、陽性反応の判定特異性が非常に高い。

加齢黄斑変性症モデルとしての組織学的変

化を経時的に長期にわたって解析する。またこの際、RPE 特異的発現を示すタンパク質に対する抗体による免疫組織学的解析も同時に行い、系統的にデータ解析する。

C1qtnf5 遺伝子異常マウスと rd6 マウスを交配し、C1qtnf5 遺伝子と Mfrp 遺伝子のダブルノックアウトマウスを作成する。rd6 (retinal degeneration 6) マウスは常染色体劣性遺伝型の網膜変性モデルマウスで眼底全域に認められる小白点と進行性の網膜変性症を主症状とする。C1qtnf5 遺伝子と Mfrp 遺伝子は dicistronic transcript を形成し、同一の mRNA 上にコードされているため、タンパク質同士も相互作用をする可能性が高い。ダブルノックアウトマウスの網膜表現型は大変興味深い。

4. 研究成果

C1qtnf5 遺伝子異常マウス作成のため C1qtnf5 の cDNA をクローニングした。今回我々は PCR を用いたクローニング法を行った。近年 high-fidelity の DNA ポリメラーゼがいくつか開発され、それらの中でも KOD-plus-DNA polymerase (TOYOBO) は非常に fidelity が高く比較的長い cDNA のクローニングも可能となった。我々はマウス眼球を摘出後、網膜色素上皮およびこれの付着した網膜組織を分離し、AGPC 法を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA から Poly(A)⁺ RNA を精製し、これを用いて first strand cDNA を作成した。この first strand cDNA をテンプレートとして、Mfrp および C1qtnf5 の全長 cDNA を KOD-plus-DNA polymerase で増幅した。挿入効率を上げるため TOPO イソメラーゼ I で活性化した 3'-dT 突出末端を持つ直鎖状のベクターである pCR-Blunt II-TOPO ベクター (invitrogen) を用いた。適切なサイズのインサートをもつプラスミドをミニプレップ

で確認後、精製し、DNA シークエンシングを行い cDNA に誤った塩基配列がないことを確認した。

クローニングした cDNA を制限酵素を用いて切り出し、得られた DNA 断片をプローブとして genomic DNA Library のスクリーニングを行った。しかしターゲティングベクターとして使用するのに適当な genomic DNA の断片を得ることができなかった。プローブの切り出しのために使用する制限酵素を変更して何種類かのプローブを作成しスクリーニングを行ったが、ターゲティングに必要と予定していたエクソンを含み、必要と考えられる領域をカバーする十分な長さをもった断片は得られなかった。Genomic Library が適当であったか他の遺伝子をプローブとして genomic Library の検討を行っており、適切でなかった場合は他社の genomic library を利用して研究を継続する予定である。

5. 研究組織

(1) 研究代表者

亀谷修平 (SHUHEI KAMEYA)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号 30302269

(2) 研究分担者

山木邦比古 (KUNIHICO YAMAKI)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号 20125751

後藤陽子 (YOKO GOTO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号 80277524

(3) 連携研究者

なし