

平成22年 6月14日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20700365
 研究課題名（和文） 弾性線維形成不全マウスを用いた加齢進行性疾患発症のメカニズム
 研究課題名（英文） The mechanism of developing age-dependent disease by loss of elasticity.
 研究代表者
 大林 徹也（Oobayashi Tetsuya）
 鳥取大学・生命機能研究支援センター・准教授
 研究者番号：80348804

研究成果の概要（和文）：

タンパク質産生効率を向上させるために人工染色体ベクターを用いたタンパク質産生系を計画した。予備実験として、CHO細胞中の人工染色体ベクターにタンパク質発現ベクターを導入し、効率よくかつ安定にタンパク質が発現することを明らかにした。さらに発現量を増加させるために導入した遺伝子のコピー数を増加させる試みを行った。その結果、通常と比較してコピー数の増大を認めたクローンを得ることに成功した。本研究ではトランスクロモソミックマウスを用いた研究を計画している。鳥取大学で開発されたトランスクロモソミックマウスは染色体工学と発生工学の融合によって開発したまったく新しい技術より作製した遺伝子改変マウスであり、従来の遺伝子改変マウスの問題点を克服できる。本研究では、複数の遺伝子を染色体の特定部位に導入できるES細胞の構築に成功した。

研究成果の概要（英文）：

To generate recombinant-DANCE protein, we utilised a state-of-the-art artificial chromosomal technology. This technology enables us to introduce a gene on a human artificial chromosome (HAC) vector (developed at Tottori University), thus the transgene can be of a virtually unlimited length, including all native regulatory regions. As pilot study, a protein expression vector was introduced into the artificial chromosome vector of CHO cell, and that protein developed efficiently and stably. To establish the animal model, I utilise a transchromosomal (TC) mouse technology, which is derived from a combination of artificial chromosomal and developmental engineering. I developed the multiple-gene inducible mouse ES cells using HAC vector system and multiple -integrase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：リコンビナントタンパク質、弾性線維、人工染色体

1. 研究開始当初の背景

皮膚や血管、肺、子宮などの伸び縮みする組織は加齢進行に伴い、引き延ばしても元に戻る性質、いわゆる弾性が低下する。組織の弾性を担っているのは、弾性線維という細胞外線維である。弾性線維はターンオーバーが遅く老化とともに劣化して再生されにくい。肺気腫、動脈の硬化、皮膚のたるみといった老化の表現型・老化関連疾患などは弾性線維の劣化・断裂が直接的な原因となっておこる。弾性線維はマイクロフィブリルの周りにエラスチンが集積し、これが酵素によってクロスリンクされることで構築される。弾性線維形成の分子基盤に関しては不明な点が多かったが、応募者らのグループを始めとしたANCE/Fibulin-5 蛋白質の解析からその全体像が明らかになりつつある。中邨智之博士は、新血管で発現している分泌蛋白質DANCEを欠損したマウスを作成した。

その結果、DANCE遺伝子(Fibulin-5ともよばれる)欠損マウスには皮膚のたるみや動脈線維や動脈板がばらばらになり動脈が硬化する、肺気腫などといったヒト老化様の表現系が観察されることこれらの表現系が弾性線維形成不全による組織の弾性の低下であることを明らかにした。[*Nature* 415:171-5, 2002] (左下図参照)。その後、

Cutis laxa(皮膚弛緩症)においてDANCE遺伝子のホモ変異が、また欧米では失明の第一要因である加齢黄斑変性症の一部においてDANCE遺伝子のヘテロ変異が見つかり(*N. En. J. Med.*, 351:346-53, 2004)、ヒトにおいてもDANCEによる弾性線維の形成・維持の破綻が疾患の原因になることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

DANCEタンパク質が弾性線維劣化による疾患の治療・予防薬として機能し得るか確認するためには、個体で大量のリコンビナントタンパク質が必要になる。そのために大量のタンパク質の産生系を構築することを目指した。

また弾性線維の形成には、DANCEだけでなく、種々の関連因子(Fibulin3, 4, LTBP2など)が関連することが明らかになってきた。このような複数の遺伝子の影響を観察するためには、複数遺伝子を導入した遺伝子改変マウスを作製することが有効であると考えた。現在の改変マウス作製技術では、複数遺伝子を導入したマウスを作製するためには多大な時間と労力が必要なため、効率よく作製する技術開発を目指した。

3. 研究の方法

タンパク質産生効率を向上させるために、鳥取大学で開発した人工染色体ベクターのタンパク質産生系への改良を行う。具体的には発現量を増加させるために導入した遺伝子のコピー数を増加させる試みを行う。複数遺伝子を導入したマウスの開発においても、人工染色体ベクターを用いたトランスクロモソミックマウス作製技術を応用する。

4. 研究成果

タンパク質産生効率を向上させるために CHO 細胞中の人工染色体ベクターにタンパク質発現ベクターを導入し、効率よくかつ安定にタンパク質が発現することを明らかにした。さらに発現量を増加させるために導入した遺伝子のコピー数を増加させる試みを行い、通常と比較して 10-1000 倍程度のコピー数の増大を認めたクローンを得ることに成功した。トランスクロモソミックマウス作製技術の有用性と汎用性をより向上させ、本研究に用いるマウスを作製する研究を行った結果、複数の遺伝子を染色体の特定部位に導入できる ES 細胞の構築に成功した。

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 2 件)

1. Horiguchi M, Inoue T, Ohbayashi T, Hirai M, Noda K, Marmorstein LY, Yabe D, Takagi K, Akama TO, Kita T, Kimura T, Nakamura T

Proc Natl Acad Sci U S A.

2009;106:19029-19034(査読有)

Fibulin-4 Conducts Proper Elastogenesis via Interaction with Cross-linking Enzyme Lysyl Oxidase

2. Suda T, Hara H, Yoshitake M, Ohbayashi T, Nakamura T, Terui T.

Immunohistochemical investigation of mid-dermal elastolysis with a history of erythema.

Am J Dermatopathol. 2008 Oct;30(5):477-80.

(査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. 遺伝子改変動物を用いた弾性線維形成における DANCE プロセッシングの検討

堀口 真仁、大林 徹也、中邨 智之

第 56 回日本実験動物学会総会

2009 年 5 月 14 日 大宮市

2. DANCE は弾性線維形成のオーガナーザー因子であり、欠損したマウスは加齢進行性疾患の表現系を示す

大林 徹也、堀口 真仁、中邨 智之

第 56 回日本実験動物学会総会

2009 年 5 月 14 日 大宮市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大林 徹也 (OOBAYASHI TETSUYA)

鳥取大学・生命機能研究支援センター

・准教授

研究者番号：80348804