

平成22年 5 月 31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790298
 研究課題名（和文） L(3)MBT トランスジェニックマウスの解析

研究課題名（英文） Analysis of L(3)MBT transgenic mice

研究代表者

宮崎 美幾 (MIYAZAKI MIKI)
 東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員
 研究者番号：30401912

研究成果の概要（和文）：

近年、エピジェネティックな遺伝子発現制御が細胞増殖や分化、幹細胞の維持など様々な生命現象に関与し、またその破綻が癌化に結びつくことが明らかになった。我々はポリコム群タンパク質である L(3)MBT 分子に着目し、その生理的機能を明らかにするとともに、その破綻がもたらす癌化への影響等を解析するために、ノックアウトマウスの作製を試みた。通常 L(3)MBT 欠損マウスは胎生早期に致死であるため、適時不活性化が可能になるようなコンディショナルノックアウトのターゲティングベクターを作製し、相同組換えした ES 細胞を得た。そしてその ES 細胞からキメラマウスを作製した。

研究成果の概要（英文）：

It has been shown that epigenetic regulation of gene expression plays important roles in a variety of biological actions, such as cell proliferation, differentiation as well as maintenance of the pluripotency of the stem cells. In this study, we focused on L(3)MBT, one of the polycomb group proteins, and tried to investigate L(3)MBT deficient mice to know the physiological function of L(3)MBT and influences caused by its dysfunction. As conventional L(3)MBT-null mice died in the early embryonic phase, a conditional targeting vector which can be used for inducible deletion of the gene were prepared. ES cells which performed homologous recombination with the vector were obtained, and the chimeric mice were generated from the ES cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：①エピジェネティクス ②癌 ③L(3)MBT

1. 研究開始当初の背景

最近、遺伝子発現の制御について、転写因子などによる、転写活性の直接的な調節によるものだけではなく、「エピジェネティカル」な制御によるものが注目されてきている。いわゆる「エピジェネティクス」とは、ヒストンの修飾などによってクロマチン構造を変化させることにより、よりダイナミックに遺伝子の発現調節をおこなうものである。その「エピジェネティカル」な遺伝子発現制御が、生物の初期発生や血球分化に重要であり、またその破綻が発ガンなどに強く関連することがわかってきており、現在、全世界で精力的に研究がなされている。

エピジェネティカルな制御を行うタンパク質として、近年、最もホットで重要視されつつあるもののひとつとして、「ポリコムグループ(PcG: Polycomb group)タンパク質」が挙げられる。PcG タンパク質は、*Drosophila* に ortholog をもつ原子的な分子である。

L(3)MBT は MBT (Malignant Brain Tumor) という特徴的なドメインを有するポリコム群タンパク質であるが、古くからヒトのミエロイド系血球腫瘍において、頻回にその染色体遺伝子座である 20q12 の欠損が報告されており、その欠損が血球腫瘍の原因であると考えられていた。

また、我々は、L(3)MBT 同様に MBT ドメインを有する類似タンパク質である MBT-1 についてノックアウトマウスを作製、解析したところ、MBT-1 は特にミエロイド系および赤血球系の前駆細胞の「分化」の促進を特異的に制御することを見出した。

さらに L(3)MBTL1 と MBT-1 が互いに結合し、複合体を形成していることを発見し(未発表)、L(3)MBTL1/MBT-1 の機能異常は、急性(骨髄性)白血病発症のメカニズムに重要な関与がある可能性が強く示唆された。

最近、L(3)MBT はそのエピジェネティカルな機能について非常に注目されている。特

に、モノメチル化ヒストン H4 を特異的に認識することにより、クロマチン構造を変化させ、遺伝子発現を抑制するという報告が相次いだ。

しかしながら、これらの多くは *in vitro* で再現されたものであり、L(3)MBT が生理的にはどのような働きをしているのか、その機能破綻が白血病等の原因に成り得るのかどうかは全く明らかにされていなかった。

以上を背景として、本申請課題では、L(3)MBTL1 について、その生理機能を解析し、その破綻が白血病発症や癌化等にどのように影響するかを見極めることを目的とした。

2. 研究の目的

L(3)MBT の生体内での機能を明らかにするとともに、この分子の機能破綻がもたらす細胞の癌化や白血病発症における影響を解析する。そのために、L(3)MBT の不活性化を適時誘導できる、もしくは臓器特異的に L(3)MBT を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作製する。

それらの解析により将来的には白血病を含めた癌等の疾病を標的とした治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

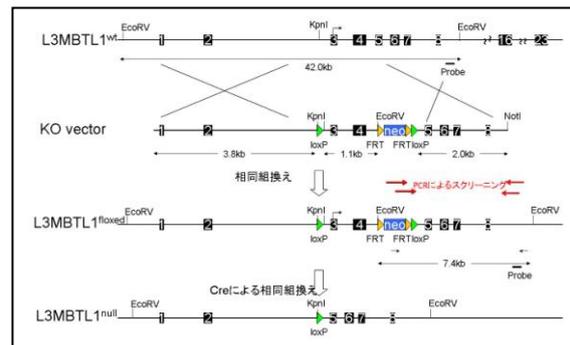
L(3)MBT 機能異常の生体における影響を調べるためには、遺伝子ノックアウトが必須である。しかし、いわゆる null-ノックアウトマウスは胎生致死である(申請者ら未発表データ)ため、コンディショナルノックアウトマウスを作製し、それぞれの遺伝子が発現の高い臓器を中心に分子レベルとフェノタイプ双方から解析し、生体の機能や細胞レベルでの分化、増殖、染色体での機能や、特に発癌における作用を解明することを研究項目とする。以下の手順で行う。

- ① loxP 配列にて L(3)MBT のエクソンを囲んだコンディショナルノックアウトターゲットベクターを作製する。
- ② ターゲティングベクターをエレクトロポレーション法により ES 細胞へ導入する。
- ③ ネオマイシン添加により、ベクターが導入された ES 細胞を選出する。
- ④ さらに PCR により、相同組換えを起こした ES 細胞を選出する。
- ⑤ 選択したクローンの ES 細胞をマウス杯盤胞へ打ち込み、キメラマウスを得る。
- ⑥ キメラマウスと野生型マウスを交配させ、L(3)MBT・floxed ヘテロ接合マウス(F1)を得る。
- ⑦ F1 同士を掛け合わせ、L(3)MBT/floxed ホモ接合子を得る。
- ⑧ テトラサイクリン誘導性、もしくはタモキシフェン誘導性 Cre リコンビネーストランスジェニックマウスと交配し、薬剤投与により適時 loxP 配列の組換え誘導が可能なマウスを構築する。もしくは、組織特異的プロモータ化に Cre リコンビネースを配したトランスジェニックマウスと交配し、組織特異的に L(3)MBT を欠損したマウスを構築する。さらに上記 2 種を組み合わせ、組織特異的に L(3)MBT の不活性化を適時誘導可能なマウスを構築する。
- ⑨ 完成したマウスを用いて L(3)MBT 欠損がもたらす影響について、増殖、分化、細胞機能、アポトーシス等の視点から観察し、L(3)MBT の生理機能を明らかにする。

4. 研究成果

まず、コンディショナルノックアウトマウスを作製するにあたり、DNA コンストラクトを作製した。

ターゲティングベクターの設計を図に示した。



図のように、ATG を含むエクソン 3-4 をはさむように loxP を配置した。ネオマイシン耐性遺伝子をイントロン 4 に配置した。ネオマイシン耐性遺伝子はそれ自身のプロモータがゲノムの遺伝子発現に影響を及ぼす可能性があるため、上流と顆粒に FRT 配列を配置することで、後に flipase により除去できるように設計した。コンストラクトは C57BL/6 マウスのゲノム DNA を用いて PCR により増幅し、バックボーンベクターには pBluescript を用いた。

完成したターゲティングベクターを制限酵素 NotI で処理して線状化し、E14.1 ES 細胞へエレクトロポレーション法によって導入した。E14.1 ES 細胞は 1000Unit/ml の LIF を含む 20%FBS 含有 DMEM 培地 200μg/ml の G418 を添加した培地で培養することで、ベクターが導入された ES 細胞を選出した。200 個のクローンをピックアップし、ゲノム DNA を抽出した。

その後、図の矢印で示すような PCR を行うことにより、相同組換えを起こした ES 細胞をスクリーニングした。最終的に 3 個のクローンを得ることができた。それらにおいてはシーケンス配列を確かめることによって、確かに相同組換えが起こっていることを確認した。

次に、これをマウスの胚盤胞に打ち込むことにより、キメラマウスを作製することを試みた。その結果、キメラマウスが生まれたが、非常に少ない数であり、さらに最終的には死亡してしまった。

原因として ES 細胞の質が低下している(分化が進んでいる)問題が考えられたため、

用いる細胞を変更して、上記の操作を繰り返し、再度セレクションをおこなった。これらのクローンについて、今回は胚盤胞への注入数を 7-8 個と 10-15 個 の 2 グループに分けたところ、後者からは産子数も少なく、キメラが生まれなかった。しかし、前者からはハイ・キメリズムのマウスが生まれた。

得られた雄キメラマウスは flipase トランスジェニックマウスに交配することで、ネオマイシン耐性遺伝子を除くと同時に L(3)MBT^{flx/+}マウスを得ることを試みた。現在のところ得られた産仔において germline transmission が確認できていないが、引き続き L(3)MBT^{flx/+}マウスを得るために継続する。

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)

[学会発表] (計 1 件)

① 宮崎美幾、新井郷子、倉部誠也、黒川淳、森真弓、宮崎徹

L(3)MBT の発癌における役割—コンディショナルノックアウトマウスの作製と解析

第 31 会日本分子生物学会年会

2008 年 12 月 12 日、神戸国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 美幾 (MIYAZAKI MIKI)

東京大学・大学院医学系研究科・

特任研究員

研究者番号：3040191

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし