

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650233

研究課題名(和文) 新奇被毛色突然変異マウスの系統確立と加齢変化に関わるエピジェネティクスの役割

研究課題名(英文) Establishment of a novel mutant mouse strain showing age-related pigmentation and epigenetic changes in the age-related pigmentation

研究代表者

石川 明 (Ishikawa, Akira)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：20211724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：インドネシア産野生マウスに発見された毛色突然変異遺伝子 $Oca2^{p-cas}$ を導入した混合系統を維持している過程で、加齢により眼色と被毛色が濃く変化する新奇突然変異体を発見した。選抜交配により、この突然変異形質で固定した系統を樹立した。mRNA-sequencing解析の結果、メラニン合成に関わる遺伝子の発現量に突然変異個体とコントロール個体間で差異はみられなかった。全ゲノムDNAメチル化解析の結果、2本の常染色体上に高メチル化領域と低メチル化領域を発見した。L-チロシンの存在下で突然変異個体の背部皮膚を体外培養するとメラノサイトの割合がコントロールより著しく増加した。

研究成果の概要(英文)：During development of a mixed strain carrying the $Oca2^{p-cas}$ (oculocutaneous albinism II; pink-eyed dilution castaneus) gene discovered from Indonesian wild mice, a novel spontaneous mutant showing age-related pigmentation was found. A line fixed for this mutant phenotype was established by selective breeding of the mutant phenotype. mRNA-sequencing analysis indicated no remarkable differences in expression levels of genes related to melanin synthesis between mutant and control mice. Whole-genome DNA methylation analysis identified two autosomes with high and low methylated regions. In vitro serum-free epidermal cell culture supplemented with L-tyrosine greatly induced the differentiation of melanocytes in mutant mice compared with controls.

研究分野：実験動物学

キーワード：遺伝学 遺伝子 マウス エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

- (1) oculocutaneous albinism II (*Oca2*) (旧遺伝子名 pink-eyed dilution (*p*)) は、マウスで発見された最も古い毛色突然変異の一つである。*Oca2* 遺伝子はマウス第7染色体上に存在し、眼、皮膚と被毛の色素沈着を減少させ、ホモ型個体はピンク色眼を呈し、被毛は agouti (*a*) 遺伝子座の影響により灰白色(*al/a*)またはクリーム色(*A/-*)を呈する。*Oca2* 遺伝子座には 56 個の対立遺伝子が報告されており、そのうちの 18 個は自然発症突然変異遺伝子であり、残りは X 線と化学物質により誘発されたものである (MGI, <http://www.informatics.jax.org/>)。18 個の自然発症突然変異対立遺伝子のうち、最初に発見された対立遺伝子はオリジナル *Oca2* と呼ばれ、日本産マウス (*Mus musculus molossinus*) に由来する。
- (2) 我々は、1990 年にインドネシア産野生マウス (*M. m. castaneus*) の子孫から、*Oca2* 遺伝子座の新しい自然発症突然変異対立遺伝子を発見し、pink-eyed castaneus (*p^{cas}*、現シンボル *Oca2^{p-cas}*) と名づけた (Tsuji et al., Exp. Anim. 44:347,1995)。
- (3) その後、*Oca2^{p-cas}* を C57BL/6JJc1 (B6) 近交系に導入した混合系統 B6;Cg-*Oca2^{p-cas}* を樹立し、兄妹交配による系統維持の過程で、ホモ型個体の中に通常のピンク色眼・灰白色被毛より眼と被毛色がやや濃い新奇突然変異個体 (黒眼個体と呼ぶ) を発見した。驚くことに、この個体の眼・被毛色は加齢により濃くなった (図 1 と 2)。予備的な交配実験と表現型観察の結果、眼・被毛色の濃くなる新奇突然変異形質は次世代に遺伝し、エピジェネティクスの関与の可能性が示唆された。

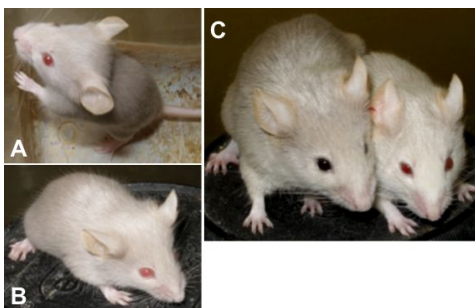


図 1. (A) 生後 1 ヶ月齢の通常の *Oca2^{p-cas}* ホモ型幼獣個体. (B) 生後 1 ヶ月齢の新奇突然変異体. (C) 生後 5 ヶ月齢の通常個体 (右側) と新奇突然変異体 (左側)。

- (4) 今までに、加齢により眼色と被毛色が濃く変化する突然変異体はマウスやヒトを含めた哺乳動物では全く報告されていない。そこで、この新奇突然変異形質

に関わる分子基盤を解析することは、エピジェネティクスの新しい制御機構の発見につながるかもしれない。

- (5) ヒトの生活習慣病、精神疾患や肥満などにエピジェネティクスが関わっていることは今日明らかになりつつあるが、不明な点が多い。本研究成果により、今までに想像にもしない新しいエピジェネティクスの役割を発見できるかもしれない。

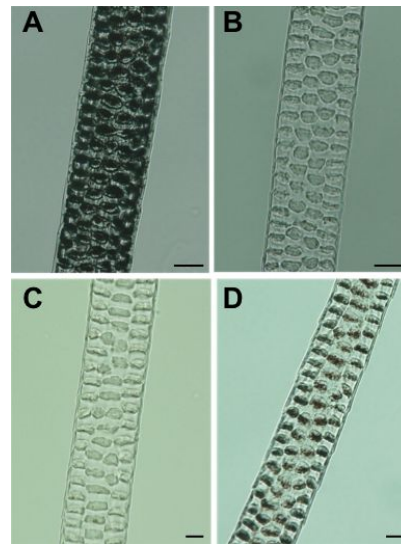


図 2. 背部体毛の光学顕微鏡像. (A) 生後 4 ヶ月齢の B6 コントロールマウス. (B) 生後 4 ヶ月齢の通常個体. (C) 生後 16 日齢の新奇突然変異体. (D) 生後 4 ヶ月齢の新奇突然変異体 (C が成長した)。

2. 研究の目的

- (1) 我々の発見したオリジナルな新奇自然発症突然変異マウスの系統を確立する。
- (2) 眼色・被毛色の加齢変化へのエピジェネティクスの関与を探究する。

3. 研究の方法

- (1) 突然変異系統の確立
毎世代、赤眼個体同士と黒眼個体同士を選抜交配し、表現型の固定化を行った。
- (2) シークエンス解析
赤眼と黒眼個体およびコントロールの B6 マウスの眼から常法にしたがって総 RNA を抽出した。RT-PCR 法により、cDNA を合成し、常法に従ってシークエンス解析を行った。また、DNA メチル化に関わるプロモーター領域を探索するために、*Oca2^{p-cas}* 遺伝子の転写開始点から上流約 1kb の塩基配列を決定した。
- (3) リアルタイム PCR 解析
赤眼個体、黒眼個体と B6 マウスの眼から常法に従って総 RNA を抽出し、cDNA

を合成した。Syber Green I (タカラバイオ、大津)で標識し、リアルタイム PCR 装置 StepOne Plus (ライフテクノロジーズ・ジャパン、東京)を用いて遺伝子発現量を定量した。

- (4) mRNA-seq (mRNA-sequencing)解析
赤眼と黒眼個体の眼から総 RNA を抽出し、cDNA を合成し、次世代シーケンサー Illumina HiSeq2000 により網羅的にシーケンス解析した。
- (5) 全ゲノム DNA メチル化解析
赤眼個体と黒眼個体のゲノム DNA を抽出し、EpiXplore Methylated DNA Enrichment Kit (タカラバイオ)を用いてメチル化 DNA 領域を濃縮し、Illumina HiSeq2000 により網羅的に全ゲノム DNA メチル化領域をシーケンス解析した。
- (6) 体外培養実験
赤眼と黒眼ラインの新生仔の背部皮膚を採取し、無血清体外培養を 14 日間行った。同様に、L-チロシンを加えて培養を行った。

4. 研究成果

- (1) 突然変異系統の確立
赤眼および黒眼形質でそれぞれ固定した 2 つのライン B6;Cg-*Oca2*^{novel-cas}/1Nga と B6;Cg-*Oca2*^{novel-cas}/2Nga を、選抜交配を繰り返して樹立した。現在、近交 15~17 世代目にある。
- (2) シーケンス解析
Oca2^{novel-cas} 遺伝子の cDNA 塩基配列を決定したところ、B6 の野生型遺伝子に対し、*Oca2*^{novel-cas} には 281 bp の欠失等が見られた。しかし、赤眼個体と黒眼個体間で塩基配列の差異は全くみられなかった。この欠失は、ゲノムレベルでは 4,140 bp の欠失に相当した (図 3)。また、*Oca2*^{novel-cas} 遺伝子の上流約 1kb のプロモーター領域の塩基配列を決定し、いくつかの DNA 結合モチーフを発見した。しかし、この領域内に CpG アイランドは全く存在しなかった。

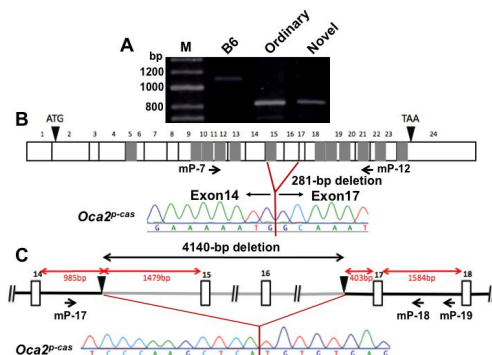


図 3. *Oca2*^{novel-cas} 遺伝子のシーケンス解析結果。(A)RT-PCR 産物のアガロースゲル電気泳動像。バンドサイズは、野生型の B6 に対し、*Oca2*^{novel-cas} は短い。(B)cDNA 解析結果。*Oca2*^{novel-cas} は 281 bp の欠失をもつ。(C)欠失領域のゲノム DNA 解析結果。*Oca2*^{novel-cas} は 4,140 bp の欠失をもつ。

- (3) リアルタイム PCR 解析
Oca2^{novel-cas} 遺伝子の発現量を赤眼個体と黒眼個体間で比較した結果、両者間で差異は見られなかった (図 4)。しかし、両者ともに、野生型遺伝子をもつ B6 に対して著しく発現量が低下していた。

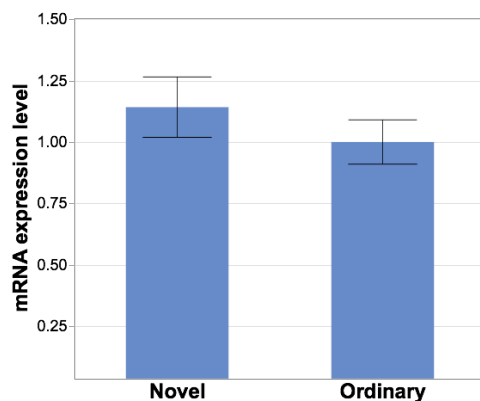


図 4 .RT-qPCR 解析結果。*Oca2*^{novel-cas} 遺伝子の発現レベルに赤眼個体と黒眼個体間で差異はない。

- (4) mRNA-seq (mRNA-sequencing)解析
赤眼と黒眼個体間で 2 倍以上発現量が異なる遺伝子を多く発見したが、メラニン合成に関わる遺伝子の発現量には赤眼と黒眼個体間で差異はみられなかった。
- (5) 全ゲノム DNA メチル化解析
赤眼個体と黒眼個体のゲノム DNA を抽出し、Illumina HiSeq2000 により網羅的に全ゲノム DNA メチル化解析を行った結果、高メチル化領域または低メチル化領域を示す 2 本の常染色体を発見することができた。
- (6) 体外培養実験
黒眼個体の皮膚をチロシンの存在下で培養すると、メラニン色素産生細胞であるメラノサイトの割合が赤眼個体より著しく増加していた。これは、メラノサイトへの分能が赤眼と黒眼個体間で異なっていることを示唆した。

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 1 件)

Ishikawa, A., Sugiyama, M., Hondo, E.,
Kinoshita, K., Yamagishi, Y.,
Development of a novel pink-eyed
dilution mouse model showing
progressive darkening of the eyes and
coat hair with aging, Exp. Anim., 査
読有、64 巻、2 号、2015、207-220

〔学会発表〕(計 4 件)

山岸祐希、杉山真言、本道栄一、石川 明、
加齢により眼と被毛色が変化する新奇
自然発症突然変異マウスの発見、日本実
験動物科学・技術 九州 2012、2012 年 5
月 24-26 日、別府国際コンベンションセ
ンター(別府市)

石川 明、加齢変化を伴う新奇自然発症
被毛色突然変異マウスの表現型の特徴
と遺伝解析、第 24 回日本色素細胞学会
学術大会、2012 年 11 月 24-25 日、長浜
バイオ大学(長浜市)

石川 明、杉山真言、本道栄一、木下圭
司、山岸祐希、発見、世界に類をみない
毛色突然変異マウス、日本動物遺伝育種
学会第 14 回大会、2013 年 10 月 12-13
日、東京海洋大品川キャンパス(東京都)

石川 明、山岸祐希、新奇被毛色突然変
異マウスにおける遺伝解析と全ゲノム
DNA メチル化解析、日本実験動物科学技
術さっぽろ 2014、2014 年 5 月 15-17 日、
札幌コンベンションセンター(札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 明 (ISHIKAWA AKIRA)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・
准教授
研究者番号：20211724

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し