

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659524

研究課題名(和文)変異マウスを用いた迅速化表現型スクリーニングによる色素細胞制御遺伝子の同定

研究課題名(英文)A rapid melanocyte-specific transgenesis system for phenotype-based gene function discovery

研究代表者

大沢 匡毅 (OSAWA, Masatake)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10344029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子機能の解明はポストゲノム時代の重要な課題である。モデル動物を用いた遺伝子変異体の表現型スクリーニングは、生理的機能遺伝子を同定するための有効な手段である。このようなスクリーニングは主に下等動物を用いて行われているが、ヒトへ応用可能な機能遺伝子を同定するためには、マウス等の高等動物を用いることが望ましい。本研究では色素細胞特異的な遺伝子ノックダウンマウスを作成する技術と体毛色異常を指標とした簡便な表現型スクリーニングを組み合わせることにより、頑強な表現型スクリーニング系を構築した。色素細胞に影響を及ぼす既知の遺伝子をノックダウンしたマウスを作製し、本スクリーニング系の有効性が確認された。

研究成果の概要(英文)：The melanocyte affords an advantageous model for studying gene function through phenotype-based analysis, since alterations in genes involved in melanocyte regulation are easily identifiable as pigmented phenotypes in the mouse. However, despite a number of recent methodological advances, the generation of genetically altered mice is still laborious and time-consuming, which largely hampers *in vivo* gene function assignment. Here, we have developed a novel melanocyte-specific transgenesis system, by which rapid gene functional assessment is allowed in mice. As a proof-of-concept study, we generated transgenic lines carrying shRNA targeting the Tyr, Mitf, Bcl2 or RBP-J genes and found that each transgenic mouse faithfully recapitulated the pigmented phenotype of the corresponding gene knockout mice. Overall, our study suggests the broad applicability of the transgenesis approach in understanding the molecular basis of melanocyte-related diverse biological phenomena.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：幹細胞 色素細胞 トランスジェニックマウス 遺伝子機能解析 モデル動物

1. 研究開始当初の背景

色素細胞を制御する遺伝子の変異体は、体色や体毛色に異常を示す表現型として容易に同定できる。特にマウスでは、体毛色異常を伴う多数の遺伝子変異体が古くから知られており、遺伝学研究のモデル系として盛んに研究が行われてきた。その結果、現在では300個以上もの体毛色異常を示す遺伝子変異座が同定されている。このような事実から、体毛色異常を指標とした表現型スクリーニングの頑強さがわかる。体毛色変異マウスは、遺伝子の機能に応じて、3種類の特徴的な表現型を示す。すなわち、色素細胞の発生に関与する遺伝子の変異は先天性の白斑を伴い、色素幹細胞制御に関与する遺伝子の変異は若年性の白髪化を呈し、色素細胞の機能を制御する遺伝子の変異は体毛色の変化を示す。このように、体毛の特徴的な表現型によって、容易に遺伝子機能を推測することができることも、このような遺伝子変異体の独自の特徴である。申請者は、これらの優れた特性に注目し、色素細胞特異的な遺伝子改変マウスを数多く作成し、表現型スクリーニングにより機能遺伝子を同定する方法を発想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、色素細胞特異的な遺伝子ノックダウンマウスを多数作成し、体毛色異常を指標とした簡便な表現型スクリーニングによって、多数の機能遺伝子を網羅的に同定することである。遺伝子機能の解明はポストゲノム時代の重要な課題である。モデル動物を用いた遺伝子変異体の表現型スクリーニングは、生理的機能遺伝子を同定するための有効な手段である。このようなスクリーニングは主に下等動物を用いて行われているが、ヒトへ応用可能な機能遺伝子を同定するためには、マウス等の高等動物を用いることが望ましい。本研究では、色素細胞特異的な遺伝子ノックダウンマウスを作成する技術と、体毛色異常を指標とした簡便な表現型スクリーニングを組み合わせることにより、頑強な表現型スクリーニングを行う。得られた遺伝子機能情報を研究資源として共有化し、医学的な応用が可能な新規機能分子を提供することが最終目標である。

3. 研究の方法

①色素細胞特異的に Cre 遺伝子を発現する Tyr-Cre トランスジェニックマウスと、染色体不活性化起こらない遺伝子座 Rosa26 に FRT ホーミングカセットが組み込まれているノックインマウス (*Gt(ROSA)26^{Sortm6}(CAG-ZsGreen1)Hze*) を交配し、得られた胚盤を培養することにより ES 細胞株を樹立した(図1参照)。
②Flp 組換え酵素によって、ノックダウンコンストラクトを ES 細胞の Rosa26 遺伝子座に簡便に挿入するためのコンストラクトを構

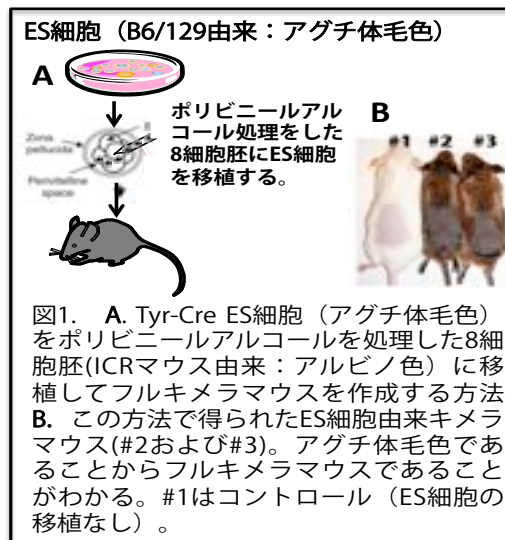


図1. A. Tyr-Cre ES細胞 (アグチ体毛色) をポリビニールアルコールを処理した8細胞胚(ICRマウス由来:アルビノ色)に移植してフルキメラマウスを作成する方法。B. この方法で得られたES細胞由来キメラマウス(#2および#3)。アグチ体毛色であることからフルキメラマウスであることがわかる。#1はコントロール (ES細胞の移植なし)。

築した (図2参照)。

③マウスの皮膚から採取した様々な細胞断面についてマイクロアレーを用いた遺伝子発現解析を行い、色素細胞に特異的に発現する遺伝子を選別した。

④図2①で示したドナーカセットを 293T に導入し、安定的発現株を得た。

⑤shRNA のノックダウン効果を定量するために、蛍光タンパク質 Venus をコードする遺伝子と shRNA の標的遺伝子をつなげたコンストラクトを作製し、このコンストラクトと shRNA を発現するコンストラクトを④で作製した 293T 細胞に導入し、蛍光強度によってノックダウン効果を定量した。

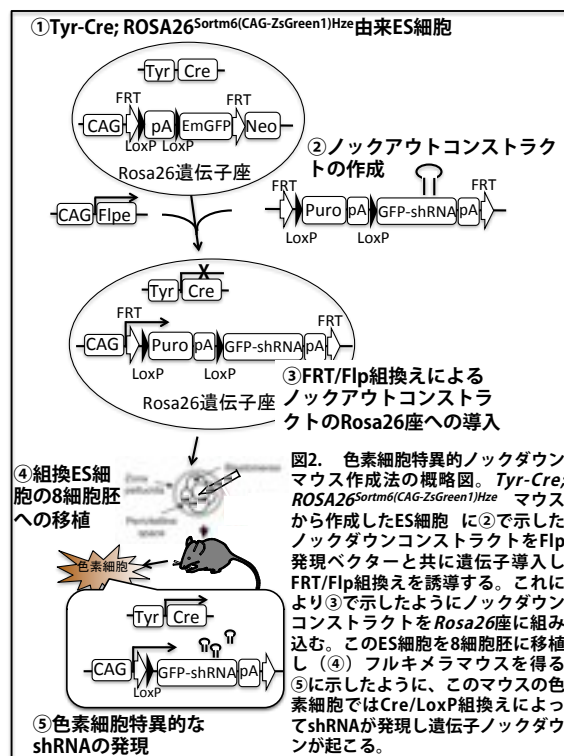


図2. 色素細胞特異的なノックダウンマウス作成法の概略図。Tyr-Cre; ROSA26^{Sortm6}(CAG-ZsGreen1)Hze マウスから作成したES細胞に②で示したノックダウンコンストラクトをFlp発現ベクターと共に遺伝子導入し、FRT/Flp組換えを誘導する。これにより③で示したようにノックダウンコンストラクトをRosa26座に組み込む。このES細胞を8細胞胚に移植し④フルキメラマウスを得る。⑤に示したように、このマウスの色素細胞ではCre/LoxP組換えによってshRNAが発現し遺伝子ノックダウンが起こる。

⑥ノックダウン効果が確認された 10 種類の shRNA について、逐次①で作製した ES 細胞に導入し、導入された ES 細胞を 8 細胞胚に移植することによりトランスジェニックマウスを作製した。

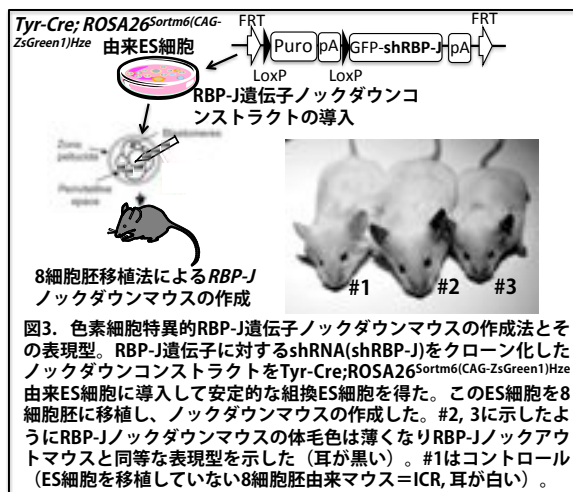
4. 研究成果

①評価遺伝子の選別-我々はさまざまな発生段階のマウス皮膚から皮膚を構成するさまざまな細胞（角化細胞、色素細胞、毛乳頭視細胞、真皮細胞、ランゲルハンス細胞）を分取して比較トランスクリプトーム解析を行った。これによって得られた色素細胞発現遺伝子群について、公的遺伝子発現データベース（Protein Atlas, Euexpress など）を活用し、in vivo で色素細胞に強く発現が認められる遺伝子 83 個を選別した。

②ノックダウン効果定量系の構築-既存のセンサーアッセイ法を改良した。Venus（蛍光タンパク質）遺伝子とノックダウンターゲット遺伝子を融合させた分子を発現するコンストラクトと shRNA をコンディショナルに発現するコンストラクトを一つのアッセイベクターに組み込むと共に、本アッセイベクターを 293T 細胞の特定のゲノム部位に 1 コピーだけ導入することにより、蛍光強度変化によりノックダウン効果を正確に定量評価することが可能になった。

③Rosa26 遺伝子座特異的遺伝子改変 ES 細胞株の樹立。Tyr-Cre トランスジェニックマウスより ES 細胞を樹立するとともに相同組換えにより attP ホーミングカセットを導入した。これにより、PhiC31 インテグレースにより shRNA 発現カセットを迅速に ES 細胞に組み込むことを可能にした。

④上記 ES 細胞を用いて、その遺伝子変異が体毛色に変化を及ぼす遺伝子（Tyr, RBP, Mitf）についてノックダウンマウスを作成し、体毛色に異常が生じることを確認した（図 3 参照）



⑤10 種類の色素細胞特異的な遺伝子ノックダウントランスジェニックマウスを作成した。これらの中には体毛色に異常を示す個体が認められた。

⑥今後、同様なノックアウトマウスを多数作製し、作製したマウスについてバイオリソースとして公に公開し、情報の共有化を可能にする予定である。

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）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

① Moriyama M, Moriyama H, Uda J, Matsuyama A, Osawa M, Hayakawa T. BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* jid.2013.11. [Epub ahead of print] 査読あり

〔学会発表〕（計 4 件）

① 大沢匡毅 World Congress for Hair Research 2014 (平成 26 年 5 月 韓国チェジュ島 招待講演「**A RAPID MELANOCYTE-SPECIFIC GENE DISRUPTION TO IDENTIFY GENES INVOLVED IN THE REGULATION OF MELANOCYTE STEM CELLS IN THE HAIR FOLLICLE**」演者)

② 大沢匡毅 第一回幹細胞を制御する微小環境の解明を目指した異分野交流研究会(平成 24 年 11 月, つくば市, 招待講演「簡便化ノックダウントランスジェニックマウスによる色素幹細胞制御遺伝子のスクリーニング」演者)

③ 大沢匡毅 第 24 回日本色素細胞学会学術大会(平成 24 年 11 月, 長浜, 招待講演「メラノサイト機能遺伝子を同定するための簡便で迅速な遺伝子改変マウス作成法」演者)

④ 大沢匡毅 第 2 回細胞再生医療研究会(平成 24 年 7 月, 神戸, 招待講演「ノッチシグナル系による皮膚上皮幹細胞系の制御」演者)

〔図書〕（計 1 件）

① 大沢匡毅. 毛包形成のメカニズムの解明と毛包再生への応用 シーエムシー出版 ファインケミカルシリーズ 毛髪研究の最前線 2013 年 7 月; p89-91.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大沢 匡毅 (OSAWA, Masatake)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10344029

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：