

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792215

研究課題名(和文) Tmem135変異マウスを用いた中枢の酸化ストレスに伴う神経変性メカニズムの検討

研究課題名(英文) The study of the oxidative stress-induced neurodegeneration in CNS by using Tmem135 mutant mice

研究代表者

樋口 仁(Higuchi, Hitoshi)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：30423320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：世界的な遺伝子解読プロジェクトによって、ヒトやマウスのすべて遺伝子配列が決定された。その結果、未だ機能が明らかにされていない遺伝子が多数存在することが明らかとなった。本研究はこれら未知の遺伝子のなかのTmem135(Transmembrane135)という遺伝子に着目した。本遺伝子の遺伝子変異マウスを高濃度酸素下で飼育すると、酸化ストレスに関連したマーカーの発現が通常のマウスより増加しており、本遺伝子が酸化ストレスに関連した遺伝子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The gene decoding projects in the world identified all genome sequence, and it was shown that there were still a lot of unknown genes.

In this study, I focused tmem135 (transmembrane135) that is one of unknown genes. I kept tmem135 mutant mice in high concentration oxygen to study the relationship between tmem135 and oxidative stress. In tmem135 mutant mice with high concentration oxygen, the oxidative stress marker was increased in comparison with normal mice. This suggested that tmem135 is the gene that associated with oxidative stress.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：酸化ストレス 遺伝子変異マウス Tmem135

1. 研究開始当初の背景

中枢神経への酸化ストレスは加齢をはじめ、パーキンソン病、アルツハイマー病、統合失調症など多くの神経変性疾患への関与が示されている。さらに近年、周術期管理でたいへん問題となっている術後せん妄にも、この酸化ストレスが関与していることが示されている。

ある疾患の病態を研究するにあたり、その疾患の動物モデルを用いた研究は極めて有用である。中枢における酸化ストレスモデルには虚血・再還流モデル、鉄ニトリロ三酢酸の投与、ある種の遺伝子変異マウスが報告されている。しかし酸化ストレスに伴う神経変性の病態は極めて複雑であり、多方面からの検討が必要である。

世界的なゲノムプロジェクトの進展により、ヒト、マウスをはじめとする様々な生物種でゲノム塩基配列が決定され、いまだ膨大な数の機能未知の遺伝子が存在していることが明らかとされている。申請者は留学先であった米国ウイスコンシン州立大学マディソン校、Department of Medical Geneticsにて様々な遺伝子変異マウスを用いて、これら機能未知の遺伝子の機能解析および疾患へ関わりについての研究を行った。これら遺伝子変異マウスのなかで特に興味深いマウスに Transmembrane135(Tmem135)の変異マウスがあげられる。本遺伝子の転写物である TMEM135 は膜タンパクの1つとされているが、その機能は全く明らかとされていない。しかし、本遺伝子変異マウスは視覚や聴覚に神経変性を伴う加齢変化が早期に認められ、また線虫の研究においては本遺伝子をノックアウトすることにより寿命が短くなると報告がされているなど、本遺伝子が加齢に関わる重要な遺伝子の1つである事が示唆されている。さらに興味深いことに、申請者はこのTmem135変異マウスを75%酸素下で飼育し酸化ストレスと負荷すると、網膜の視細胞が急激なアポトーシスを起こすことを見いだした。すなわちこれはTmem135が何らかのかたちで酸化ストレスを制御している遺伝子あることを示唆しており、視細胞における酸化ストレスによる神経変性および細胞死の良好な動物モデルであることを示している。

そこで申請者はこのTmem135変異マウスが視細胞のみに限らず、中枢の酸化ストレスに伴う神経変性および細胞死さらには酸化ストレスに伴う全身的な障害の動物モデルになるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

申請者の最終的な目的は、Tmem135変異マウスが視細胞のみに限らず、中枢の酸化ストレスに伴う神経変性および細胞死さらには酸化ストレスに伴う全身的な障害の動物モデルとなるかを明らかにすることである。さらにTmem135変異マウスに酸化ストレスを加えた際の様々な臓器での病態を明らかにすることにより、Tmem135遺伝子と酸化ストレスとの関係および本遺伝子の機能を明らかにすることである。

これらの目標を達成するため、本研究課題では以下のような具体的目標を設定した。

(1)Tmem135変異マウス(FUN025)の研究を遂行するための FUN025 マウスラインの確立

一連の研究を遂行するにあたり Tmem135 遺伝子変異マウス(FUN025)のマウスラインを構築する必要がある。そのため本遺伝子変異マウスを保有している米国ウイスコンシン州立大学マディソン校よりマウスの譲渡を受け、マウスラインを確立する。

(2) Tmem135 変異マウス(FUN025)に酸化ストレスを負荷した際の中枢神経ならび各種臓器における変化の分子生物学的検討

FUN025 マウスに酸化ストレスを負荷した際の中枢神経および各種臓器の変化を調べるため、75%の高濃度酸素下で2週間飼育した FUN025 マウスと野生型 (Wt) マウスならびにコントロール飼育 (大気下) した FUN025 マウスと Wt マウスの海馬、顎下腺、肺、肝臓、腎臓の各種臓器を採取し、酸化関連物質および炎症関連物質の遺伝子発現量、およびタンパク発現量を各マウス間で比較する。

3. 研究の方法

(1)Tmem135 変異マウス(FUN025)の研究を遂行するための FUN025 マウスラインの確立

米国ウイスコンシン州立大学マディソン校よりTmem135遺伝子変異マウス(FUN025)の譲渡を受けた後、申請者の施設にてマウスの交配を行った。生まれてきた仔マウスの尾よりDNAを抽出し、このDNAをPCRプライマー (Forward Primer: GGTTTTGGCAG GTGTGTC, Revers Primer : TGTGTGCTTG GCAACTTCTC) を用いてPCRを行った。その後PCR産物に制限酵素Cac 8 Iを加え、37°Cでインキュベートした後、電位泳動を行い、得られるバンドの大きさによりhomozygous, heterozygousおよび遺伝子変異なしと決定するRFLP法 (Restriction Fragment Length Polymorphism、制限酵素断片長多型) により遺伝子型の決定 (genotyping) を行い、次世代の交配を行わせFUN025マウスラインの確立を行った。

(2) Tmem135 変異マウス (FUN025) に酸化ストレスを負荷した際の中樞神経ならび各種臓器における変化の分子生物学的検討

本遺伝子変異マウスおよび野生型マウス (Wt)を高濃度酸素下で飼育するため、専用のアニマルチャンバー(A-15274-P)および酸素濃度をコントロールするために酸素コントローラー (ProOx 110) を購入した。これらを用い FUN025 マウスおよび Wt マウスを75%の高濃度酸素下で2週間飼育し、海馬、顎下腺、肺、肝臓、腎臓の各種臓器を採取した。さらコントロール飼育 (大気下) の FUN025 マウスおよび Wt マウスからも海馬、顎下腺、肺、肝臓、腎臓を採取した。

①Real-time PCR による酸化関連遺伝子および炎症関連遺伝子の発現量の検討

各マウス群より抽出した臓器より RNA を抽出し、QuantiTect Reverse Transcription キットを用いて cDNA に逆転写を行った。得られた cDNA を用いて酸化関連物質の Heme oxygenase-1(HO-1), Superoxide dismutase1(SDS1), SDS2, iNOS、炎症関連物質の TNF α , IL-6 のおよび内部標準として β -actin の real-time PCR を行った。各種遺伝子の発現量を β -actin 発現量との比として

表し、各臓器における遺伝子発現量を 75% 酸素飼育 FUN025 マウス、75%酸素飼育 Wt マウス、コントロール飼育 FUN025 マウス およびコントロール飼育 Wt マウス間で比較した。

②ウエスタンブロット法による酸化関連タンパク質の発現量の検討

各マウス群より抽出した臓器よりウエスタンブロットを行うためのタンパク溶解液を作成した。NuPAGE システムを用い、酸化関連タンパクである HO-1 の発現量をウエスタンブロット法により定量し、75%酸素飼育 FUN025 マウス、75%酸素飼育 Wt マウス、コントロール飼育 FUN025 マウスおよびコントロール飼育 Wt マウス間で比較した。

4. 研究成果

(1)Tmem135 変異マウス(FUN025)の研究を遂行するための FUN025 マウスラインの確立

ウイスコンシン州立大学マディソン校より譲り受けた FUN025 マウスの交配に成功した。また RFLP による genotyping も行えるようになり (図 1)、FUN025 マウスを安定して供給できるマウスラインを樹立することができた。

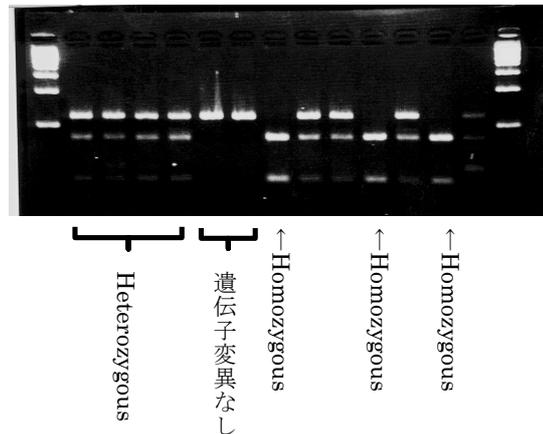


図 1. RFLP による genotyping の結果

(2) Tmem135 変異マウス(FUN025)に酸化ストレスを負荷した際の中枢神経ならび各種臓器における変化の分子生物学的検討

当初の本研究課題は中枢神経をターゲットとし、75%酸素飼育 FUN025 マウスの海馬における HO-1, SDS1, SDS2 の遺伝子発現量を Real-time PCR で定量したが、他のマウス群 (75%酸素飼育 Wt マウス、コントロール飼育 FUN025 マウス、コントロール飼育 Wt マウス) と比較し有意な遺伝子発現の増加を見いだすことが出来なかった。そこで中枢神経のみではなく、75%酸素飼育 FUN025 マウスの唾液腺、肺、肝臓および腎臓の各臓器においても酸化関連遺伝子の発現に変化がないかを検討した。その結果、75%酸素飼育 FUN025 マウスの腎臓において、HO-1 遺伝子の発現が、他のマウス群と比較して増加していた(図 6)。肺においても HO-1 遺伝子の発現は 75%酸素飼育 FUN025 マウスおよび 75%酸素飼育 Wt マウスで、コントロール飼育と比較して増加していたが、FUN025 マウスと Wt マウス間で違いは見られなかった(図 4)。

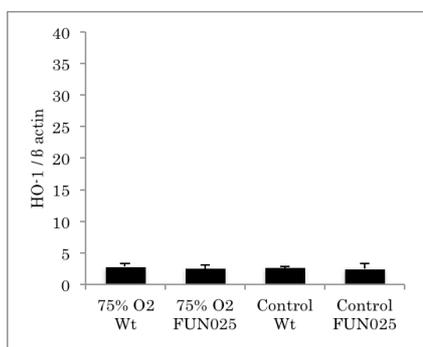


図 2. 海馬における HO-1 遺伝子の発現

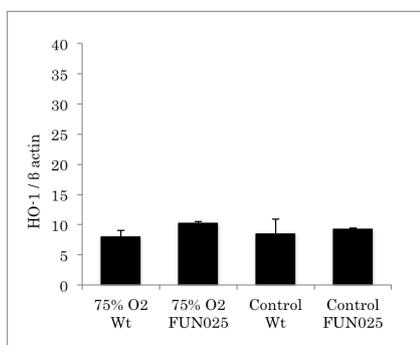


図 3. 顎下腺における HO-1 遺伝子の発現

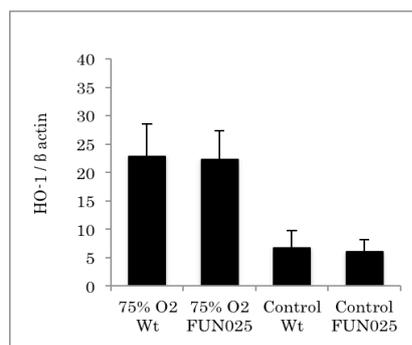


図 4. 肺における HO-1 遺伝子の発現

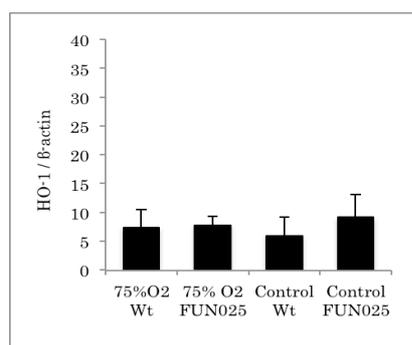


図 5. 肝臓における HO-1 遺伝子の発現

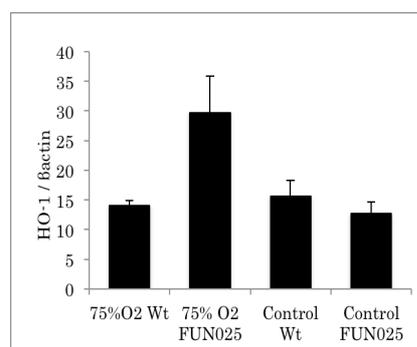


図 6. 腎臓における HO-1 遺伝子の発現

この HO-1 について、そのタンパク発現を各種マウス(75%酸素飼育 FUN025 マウス、75%酸素飼育 Wt マウス、コントロール飼育 FUN025 マウス、コントロール飼育 Wt マウス)の各臓器で定量したが、現時点では明らかな HO-1 タンパクの増加は見いだせていない。

本研究結果より FUN025 マウスの腎臓は酸化ストレスが加わった際、酸化を受けやすい可能性が示唆された。本研究において、Tmem135 遺伝子と中枢における酸化ストレスとの関連は明らかに出来なかったが、Tmem135 遺伝子は酸化ストレス反応

に関わる遺伝子である可能性が示唆された。

(3)連携研究者
()

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)

研究者番号：

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

www.okayama-u.ac.jp/user/shimasui/

6. 研究組織

(1)研究代表者

樋口 仁 (Higuchi Hitoshi)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：30423320

(2)研究分担者

()

研究者番号：