

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640046

研究課題名(和文)被毛パターン変異ラットを用いた反応拡散モデル実証のための実験モデル系の創出

研究課題名(英文) Model system to evaluate reaction-diffusion system using coat pattern-mutant rats

研究代表者

庫本 高志 (Takashi, Kuramoto)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20311409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラットの被毛パターン変異であるhooded変異とDownunder変異を対象に、メラノサイトの挙動から反応拡散モデル方程式を導出することを最終的な目的とした。まず、個体レベルでメラノサイトをモニターできるDct-LacZトランスジェニックラットを作成した。また、Du変異をラット第3染色体の約1Mbに局限し、Zeb2遺伝子を有力な候補遺伝子として挙げた。本研究の成果により、hooded胚とDownunder胚におけるメラノサイトの発生をモニターする実験ツールが整備できた。今後は、hooded/Downunderモデル系から新たな反応拡散モデル方程式が導出されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Reaction-diffusion (RD) model is one of the best-known theoretical models used to explain self-regulated pattern formation. In this study, we tried to establish two rat coat pattern mutations (hooded and Downunder) as an in vivo model to evaluate the RD model in mammals. The hooded rats have a pattern in which the entire ventral surface is white. Dorsally pigmentation is limited to the head and shoulders and a mid-dorsal stripe. The downunder pattern manifests when rats are homozygous for the hooded mutation. The downunder rats have pigmentation in ventral part of the trunk in addition to the hooded pattern. We created a F344-Tg(Dct-LacZ) transgenic rat line to monitor the development of the melanocytes. We mapped the Downunder locus finely to about 1 Mb genomic region on rat chromosome 3 and found the Zeb2 gene as a good candidate for the Downunder. Using the transgenic rats, we could monitor the development of the melanocytes in the hooded and Downunder embryos in the further study.

研究分野：実験動物学

キーワード：ラット 変異体 毛色 Kit Zeb2 メラノサイト

1. 研究開始当初の背景

パターン形成現象に関する有力な理論モデルとして反応拡散モデルがある [Kondo and Miura, 2010]。そこでは、活性因子と抑制因子の相互作用によって様々なパターンが形成される。コンピューターシミュレーションによって、魚の縞模様、肢の指、羽毛や毛の配置などのパターンが再現されている [Asai et al, 1999; Miura et al, 2006]。2012年に、魚類の色素パターンの生成の分子メカニズムが明らかになって来たが [Inaba et al, 2012]、豊富な色素パターンを持つ哺乳動物の場合に真に適合するか否かは明確ではない。

我々は、ラットに特徴的な被毛変異である hooded と Downunder が反応拡散モデルで説明でき、またこのモデルを実証できるモデル系になりえないかと考えた。Hooded (h) 変異のホモラット(h/h) は、頭巾斑ラットとも呼ばれ、頭部と背部に帯状の特徴的な色素分布を示す。最近の研究から、その原因は、Kit 遺伝子(細胞膜に存在する受容体をコード)のイントロン1に内在性レトロウイルスが挿入したものであることが分かった [Kuramoto et al, 2012]。一方、Downunder (Du) 変異は、我々が愛玩用ラットの実験動物化の過程で分離した毛色パターン変異で、h/h ラットの背部の色素分布が、鏡で映したように、腹部にも分布する。

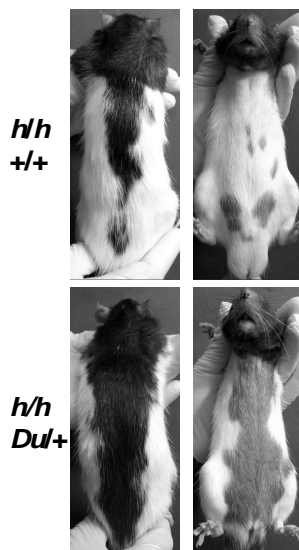


図1、hoodedラット(上)と Downunderラット(下)の表現型

2. 研究の目的

Hooded, Du 変異モデル系をメラノサイトの分布における反応拡散モデルの実証に用いるために、以下を目的とした。

- 1、hooded ラット胚、Downunder ラット胚における、メラノサイトの分布を明らかにする。
- 2、Du 変異の責任変異を同定する。
- 3、メラノサイトの挙動と一致するような反応拡散モデル方程式を確立する。

3. 研究の方法

1、メラノサイトの発生をモニターできるラットの作製

メラノサイト特異的な遺伝子 Dopachrome tautomerase (Dct) に注目して、のプロモーター領域の下流に LacZ 遺伝子をつないだトランスジーンを持つ Tg ラットを作製した。ラット Dct 遺伝子上流のゲノム DNA を増幅するために、以下のプライマーを合成した。こ

rDct₋₃₂₃₇-XmaI

ATTACCCGGGCCCGGCATAGAGTAGGAGAG

rDct₊₄₂₂-XhoI

ATTACTCGAGCGGCTCGGCTTCCCACCTGT

このプライマーにより Dct 遺伝子の-3237 から+422 までの 3659bp が増幅できる。

増幅されたゲノム DNA を XmaI と XhoI で処理し、pLacZ-Basic (Clontech) にクローニングした。

2、Du 座位のファインマッピング

Du 座位のリシーケンスを行った。

4. 研究成果

1、メラノサイトの発生をモニターできるラットの作製

F344/Stm ラットのゲノム DNA をテンプレートにして、rDct₋₃₂₃₇-XmaI と rDct₊₄₂₂-XhoI を用いて、Dct 遺伝子上流約 3.6kb を増幅した。この DNA 断片を XmaI と XhoI で処理し、pLacZ-Basic の Multi cloning site にクローニングした。Dct 遺伝子上流配列を含む B

ラスミド(pTK418)を XmaI と SalI で処理し、Dct 遺伝子 (3.6kb), LacZ(3.0kb), polyA(1.6kb)を含む全長 8.2kb の DNA 断片を得た。Hooded 変異をホモにもつ F344/NS1c から採取した受精卵にマイクロインジェクションし、11 頭の産子を得た。

これらの産子の尾端より DNA を抽出し、PCR 法により LacZ 遺伝子の有無を判定した。その結果、1 頭の雌が導入遺伝子を持っていることが判明し、ファウンダーラットとした。このファウンダーラットを F344/NS1c と交配子、F1 産子を得たところ、導入遺伝子が伝達されていることが分かった。そこで、この Dct-LacZ 遺伝子をもつ系統を、F344-Tg(Dct-LacZ)とし、系統維持している。

2、Du 変異のファインマッピング

Du 変異を明らかにするために、Du 座位のファインマッピングを行った。そのために、Du 座位を含むラット第 3 染色体 24.21Mb ~ 28.7Mb の領域について、BN ラットのゲノム配列をもとに DNA チップを作製し、F344 ラットと F344.Cg-Du ラットのゲノム DNA を濃縮し、塩基配列を決定した。その結果、F344 ラットと F344.Cg-Du ラット間での多型を複数得た。得られた DNA 多型のうち 13 個を SNP マーカーとして開発し、F344.Cg-Du のジェノタイピングを行った。その結果、rs197659597 (24,799,231bp) から D3-Du-SNP12 (25,836,750bp) の間、1,038kb の間にマッピングできた。この領域には glycosyltransferase-like domain-containing protein 1 (Gtdc1) 遺伝子と zinc finger E box-binding homeobox 2 (Zeb2) 遺伝子が存在していることが知られている。しかし、F344.Cd-Du ラットにおいて両遺伝子のコーディング配列には、変異がなかった。近年、Zeb2 遺伝子のノックアウトマウスが作製され、Zeb2 がメラノサイトの発生に関与していることが示された[Denecker et

al, 2014]。また、リシークエンスの結果、明確な欠失変異は見いだせなかった。従って、Du 変異は、Zeb2 の調節領域等に存在する挿入変異である可能性が高い。

3、今後の予定

今後は、Dct-LacZ ラットの胚を精査することで、hooded 変異をホモにもつ胚におけるメラノサイト挙動を明らかにする。さらに、F344.Cg-Du ラットの胚におけるメラノサイト挙動を明らかにすることで、Du 変異を効果をみる。そして、これらのデータをもとに、Hooded, Du 変異モデル系をメラノサイトの分布における反応拡散モデルの実証に用いることができるかを検証する。

本研究で得られた F344-Tg(Dct-LacZ)トランスジェニックラットは、ラットのメラノサイトの発生、移動をモニターできる有用なリソースである。

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0件)

[学会発表](計3件)

庫本高志、毛色遺伝子からみた実験用ラットの起源 シンポジウム「色素細胞および毛色の生物学」、第 61 回日本実験動物学会総会、平成 26 年 5 月 15 日~17 日、札幌コンベンションセンター

庫本高志、中西 聡、Birger Voigt、芹川忠夫、ラット頭巾斑 (hooded) 変異の同定、第 60 回日本実験動物学会総会、平成 25 年 5 月 15 日~17 日、つくば国際会議場

Kuramoto T, Yokoe M、Genetic fine mapping of a rat dominant ventral spotting gene, Downunder (Du)、the

XXII International Pigment Cell
Conference, September 4-7, 2014,
Shangri-La Hotel Singapore, Singapore

〔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

庫本高志(京都大学・医学研究科・准教授)

研究者番号: 20311409

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

三浦 岳(九州大学・医学研究科・教授)

研究者番号: 10324617