

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670231

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ初期発生過程からのAire標的遺伝子の解明

研究課題名(英文)Role of Aire in the early development of zebrafish

研究代表者

松本 満 (MATSUMOTO, Mitsuru)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号：60221595

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)：ゼブラフィッシュ初期発生過程におけるAireの機能を切り口として、Aireの標的遺伝子を明らかにすべくノックダウン実験を行ったが、安定した形質を認めることが出来なかった。次いで、TALEN法を用いてz-Aire欠損ゼブラフィッシュを樹立する方法に変更し、z-AireのExon 2を標的とする発現ベクターを構築した。In vitro transcriptionによりExon 2をはさみ込むRNA産物を合成し、ゼブラフィッシュ初期胚に注入してAire欠損ゼブラフィッシュを樹立した。現在、Aire欠損ゼブラフィッシュの形質解析に従事しており、その情報に基づいてAireの標的遺伝子の解明を目指す。

研究成果の概要(英文)：We have been trying to identify the target genes of Aire by investigating the role of Aire in early development of zebrafish. Our initial trial to achieve this using knockdown method did not produce stable phenotypes in zebrafish. We therefore generated zebrafish lacking z-Aire by the use of TALEN method. We targeted Exon 2 of z-Aire, and established mutant zebrafish by injecting RNA that targets the Exon 2 of z-Aire. We are currently examining the phenotypes of mutant zebrafish, and are planning to identify the target genes of Aire based on studying the phenotypes of zebrafish lacking z-Aire.

研究分野：免疫学

キーワード：Aire zebrafish 自己免疫

1. 研究開始当初の背景

遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子 *Aire* の機能解明は、自己免疫疾患の原因究明に大きな手がかりを与えるものと期待されている。*Aire* 欠損マウスの胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell: mTEC) では、多数の組織特異的自己抗原 (tissue-restricted antigen: TRA) 遺伝子の発現レベルが低下していることから、*Aire* は mTEC における TRA を標的遺伝子として、その発現レベルを維持することにより、胸腺における自己反応性 T 細胞の除去にはたらくと考えられている。しかしながら、*Aire* 欠損マウス mTEC における TRA の発現変化が、必ずしも当該 TRA に対する自己免疫応答と相関しないという事実をふまえ、私どもはこのモデルの再検討が必要であると考えている。すなわち、*Aire* の標的遺伝子が TRA であるとする従来のモデルに替わり、*Aire* が mTEC の分化誘導因子として作用するモデル (分化モデル: maturation model) を提唱している (*Eur. J. Immunol.* 2011)。このモデルは、*Aire* 発現細胞を GFP によって可視化した *Aire*/GFP ノックインマウスにおいて、*Aire* 欠損 mTEC が未分化な形態を呈したことに基づく (*J. Exp. Med.* 2008)。TRA を標的遺伝子とするモデル、あるいは分化モデルのいずれが正しいか、さらにはそれ以外の未知の *Aire* による自己寛容成立メカニズムが存在するかという問題を解明するには、*Aire* の標的遺伝子が何であるかを明らかにする他はない。しかしながら、一般に転写因子の標的遺伝子を特定する作業は容易ではなく、特に *Aire* の場合には *Aire* を恒常的に発現する細胞株が存在せず、また純化した *Aire* 発現 mTEC を大量に調製することが困難であるため、通常の生化学的・分子生物学的アプローチから *Aire* の標的遺伝子を同定することは容易ではない。

2. 研究の目的

以上の点をふまえ、本研究では申請者が新たに見出したゼブラフィッシュ初期発生における *Aire* の機能を切り口として、*Aire* の標的遺伝子を明らかにする。本研究課題では一見、自己免疫疾患の病態解明とはかけ離れている初期胚を研究材料として用いるが、転写因子の標的遺伝子に対する作用様式は、細胞種によらず基本的に同じであることから、得られた成果は mTEC における *Aire* の標的遺伝子同定作業のためのきわめて有用な知見となり、mTEC における同様な研究に対しても、貴重な技術的基盤を提供するものと思われる。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュ初期発生過程における z-*Aire* の役割を (1) レスキュー実験、および

(2) z-*Aire* の発現解析によって確認するとともに、(3) モルフォリノ注入に替わり、TALEN 法を用いて z-*Aire* 欠損ゼブラフィッシュを樹立する。それによって、形質の安定した個体材料を用いて genetic、epigenetic な解析が可能な実験系を構築する。

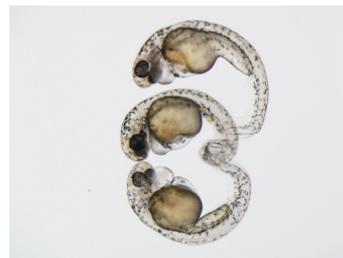
4. 研究成果

(1) z-*Aire* ノックダウン表現型のレスキュー実験による、*Aire* の初期発生過程における役割の確認

当初行ったゼブラフィッシュ初期発生における *Aire* 機能の研究では、*Aire* のノックダウンが尾の湾曲や心臓の形成不全といったきわめて特徴的な表現型をもたらすことを見出していた (下図)。



コントロール・モルフォリノ処理



Aire ノックダウン・モルフォリノ処理

しかしながら、モルフォリノを用いた実験では、いわゆる off-target 効果がしばしば観察されるため、z-*Aire* ノックダウンによって観察された表現型が、野生型 *Aire* によってレスキューされることを *in vitro* transcription によって作製した human *Aire* RNA の同時注入によって確認する実験を行った。その結果、*Aire* のノックダウンによる尾の湾曲や心臓の形成不全は比較的再現性よく観察されたものの、human *Aire* RNA の同時注入によって表現型をレスキューすることは出来なかった。すなわち、当初観察された表現型が、off-target 効果による可能性を排除することが出来なかった。

(2) z-*Aire* の発現解析

一般に、モルフォリノを用いたノックダウン法で観察される表現型については、当該遺

伝子の発現箇所と一致する表現型であることが求められる。そこで、ゼブラフィッシュ胚を用いて、初期発生におけるz-Aireの発現組織をin situ hybridization法によって検討した。その結果、z-Aireの発現組織は眼球や脳組織、脊椎といった比較的幅広い発現を示した。この結果は、モルフォリノを用いたノックダウン法で観察された表現型と必ずしも矛盾する結果ではなかったが、真の効果、あるいはoff-target効果のいずれかを積極的に支持する結果ではなかった。

(3) TALEN法を用いたz-Aire欠損ゼブラフィッシュの樹立

Transcription activator-like effector (TALE) domains for efficient TALE nucleases (TALEN)は、従来のモルフォリノを用いた一時的なノックダウンと異なり、ゲノムレベルで安定変異体を樹立出来る革新的な遺伝子改変技術である。そこで、本技術を用いてz-Aire欠損ゼブラフィッシュを樹立することとした。

TALEN法のための遺伝子構築

エンドヌクレアーゼDNA切断ドメインをはさむTALE DNA結合ドメインをz-AireのExon 2を標的として設定し、Voytas達の報告に従い(Nucleic Acids Res. 2011)、対応するrepeat-variable di-residue (RVD)発現ベクターを構築した。

In vitro transcriptionにより、標的領域(Exon 2)をはさみ込むRNA産物を合成し、ゼブラフィッシュ初期胚にマイクロインジェクション法によって注入した。RNA注入操作を行った胚からゼブラフィッシュを発生させ、性成熟に達した時点でF1胚を取得した。

F1胚ゲノムのz-Aire Exon 2が期待通りinsertion/deletionによって変異した個体を選別し(Exon 2に-11bpのdeletionが存在)、ノックアウトラインを樹立した。こうして樹立したヘテロ個体の掛け合わせにより、メンデル則に従って表現型の安定したz-Aire欠損ゼブラフィッシュを大量に得ることが出来る。現在はホモ個体の作出を行っている過程であり、モルフォリノを用いてz-Aireをノックダウンして観察された表現型が、真のz-Aireの機能欠損に基づくものであったかどうかは間もなく判明する予定である。

以上、本研究期間中においては、当初目指したAireの標的遺伝子の同定には至らなかったが、TALEN法を用いてz-Aire欠損ゼブラフィッシュを樹立することが出来た点は大きな成果であると考えられる。z-Aire欠損ゼブラフィッシュは、アンチセンス・モルフォリノを用いたz-Aireノックダウンゼブラフィッシュに比べ、表現型、遺伝子発現の安定性から、z-Aireの標的遺伝子を同定するための理想的な実験材料を提供してくれるものと思われる。

以下に、今後取り組むべき実験を列挙し、併せてその考察を行う。

z-Aire欠損ゼブラフィッシュを用いたAire標的遺伝子の同定

(1) z-Aire欠損に伴う発現遺伝子変動の解析

z-Aireノックアウト初期胚、および対照初期胚から調製したRNAを用いてarray解析を行い、z-Aireの標的遺伝子を検索する。その際、z-Aire抑制個体の表現型から、既にその候補となっているWnt、SHH系に関わる遺伝子を重点的に拾い上げる。

(2) z-Aire過剰発現初期胚の解析

z-Aire欠損ゼブラフィッシュの樹立とは逆に、ゼブラフィッシュ初期胚へのz-Aire RNA注入によるgain-of-function実験を行い、z-Aireの個体レベルでの作用をより明確にする。

(3) Aireの標的遺伝子への作用様式の解析

本研究によってz-Aireの標的候補遺伝子を同定した後は、Aireによる標的遺伝子の作用メカニズムを分子生物学的・生化学的手法を用いて明らかにする。

Aire欠損が、マウス初期発生に特に障害をもたらさないのに対して、少なくともモルフォリノを用いたz-Aireノックダウン実験によってゼブラフィッシュ初期発生に明確な障害が観察されたことは、Toll遺伝子の場合との類似性が注目され、興味深いと考えた。すなわち、ショウジョウバエにおけるTollの変異は自然免疫と発生の両方に影響を及ぼすのに対して、哺乳類では、もっぱら自然免疫系の障害のみをもたらす。ここで重要な点は、ショウジョウバエのTollは、自然免疫系と発生過程のいずれの機能においても、同じシグナル伝達経路(NF- κ B活性化経路)を介して作用する点である。つまり、本研究課題においても、ゼブラフィッシュ初期胚におけるAireの標的遺伝子や、その作用様式が解明出来れば、それはとりもなおさず、獲得免疫系(mTECがはたらく自己寛容成立機構)においても、Aireの標的遺伝子や、その作用様式を明らかにできる可能性が高い。

他方、胸腺における自己反応性T細胞の除去機構(negative selection)については、TCRトランスジェニックマウスを用いた実験系が導入されて以来、自己寛容の成立機構にはmTECが発現する自己抗原の「量的」変動が強調されている。Aireが自己抗原遺伝子の発現レベル制御を介して自己寛容の成立に関わるとするモデルも、その概念に沿った解釈に他ならない。本研究ではmTECにおけるAireの機能解析からはあえて距離を置き、申請者が新たに見出した発生初期におけるAireの機能解析に取り組んでいる。初期発生におけるAireの研究は一見、自己寛容の成立機構解明の趣旨から外れるように見える

が、mTEC を対象とした従来のアプローチでは得られなかった成果が生まれることを期待している。

Aire 欠損にともなう自己免疫疾患の発症病態の解明においては、転写因子 Aire の標的遺伝子を同定することこそが Aire 機能の全貌解明に必要不可欠であると考え、本研究課題を実施するに至った。Aire を含め、転写因子の標的遺伝子、および標的遺伝子に対する作用様式は細胞種によらず基本的に同じであることから、初期発生における Aire の作用機序の解明は、そのまま胸腺髄質上皮細胞における Aire の機能解明への貴重な情報となり、自己寛容成立機構における Aire 機能の解明、それに基づく自己免疫疾患の原因究明に大きく資すると期待している。

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 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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ier/autoimmunity/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 満 (MATSUMOTO, Mitsuru)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号：60221595