

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660252

研究課題名(和文) Mx1遺伝子新規バリエーションの機能解析によるMx1の新規生理機能の解明

研究課題名(英文) A physiological significance of Mx1 variant

研究代表者

汾陽 光盛 (Kawaminami, Mitsumori)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：00153007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗ウイルス遺伝子として知られるMx1遺伝子は、一般の実験動物マウスでは偽遺伝子とされ機能は無いとされてきた。申請者は、偽遺伝子とされるMx1の発現が性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)によって刺激されること、インターフェロンも同様に不完全なMx1遺伝子発現を促進することを発見した。本研究では、新規バリエーションの機能解析を目指した。新規バリエーションは新規オープンリーディングフレームを持つことを明らかにし、配列を登録した(DDBJ: LC021361)。新規配列に対するペプチド抗体を作製した。更にMx1ノックアウトマウスを作製した。

研究成果の概要(英文)：Mixovirus resistance 1 (Mx1) is known as a pseudogene in laboratory mouse. We found the expression of Mx1 mRNA is stimulated by GnRH and Interferon in mouse. In this project we examined the splicing variants and found a novel composite mRNA (DDBJ: LC021361). This variant consists an open reading frame. We raised anti-this variant peptide and made a knockout mouse.

研究分野：獣医生理学

キーワード：GnRH interferon Mx1 Splicing variant composite RNA

1. 研究開始当初の背景

Mx1 (myxovirus (influenza virus) resistance 1) は、インターフェロンによって誘導される代表的なウイルス抵抗性遺伝子であることがよく知られている。Mx1 によって野生マウスはインフルエンザウイルス感染を耐過する一方、Mx1 遺伝子の一部に欠損のあるpseudogene(欠失型遺伝子、偽遺伝子) しか持たない C57BL/6J やBALB/c などは、インフルエンザウイルスの感染で死亡する。申請者は、Mx1 遺伝子の転写産物を調べることで、イントロン配列を含む全く新しいバリエーションを発見した。このバリエーションは欠失型遺伝子からも作られ、しかもその配列の相同性はデータベースに登録されているほ乳類間では、ほぼ100%である。更にその配列は調べた細胞で著しい増殖抑制活性を示した。この申請者独自の研究成果を更に進展させる必要があった。

2. 研究の目的

Mx1 遺伝子バリエーションの合成調節、体内分布、細胞増殖調節機序を調べ、Mx1 遺伝子の新規生理機能を明らかにすること、研究期間途中で共同研究者を得て、Mx1 ノックアウトマウスの作出を目指すこととした。

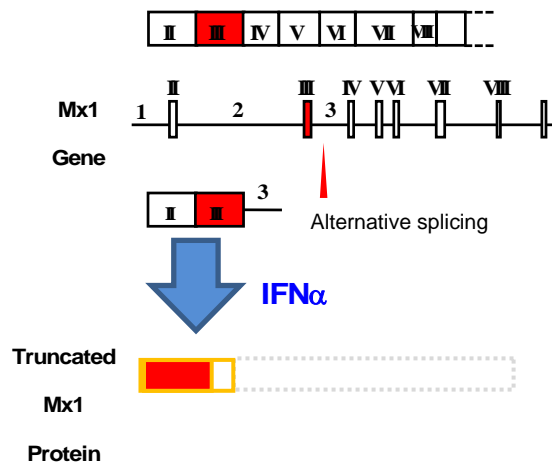
3. 研究の方法

C57BL/6Jを通常の実験用マウスとして、Msm/Msを野生型(Mx1遺伝子を有するマウス、理研から導入)として用いた。免疫組織化学、組織からのRNA抽出とリアルタイムPCRを行った。更に、CRISPR-Cas法でMx1遺伝子ノックアウトマウスを作出した。

4. 研究成果

Mx1はDynamaminと呼ばれる大分子G蛋白質ファミリーの一員とされ、細胞質で機能すると考えられている。そこでMsm/Ms下垂体とC57BL/6J下垂体を用いて免疫染色を行ったところ、野生型では核内にも分布が見られたのに対し、偽遺伝子を発現するC57BL/6Jでは分布は細胞質に止まった。この結果は、フルレングスのMx1には、核内移行シグナルが有ることを示唆している。一方、偽遺伝子と解されてきた実験動物マウス(C57BL/6Jなど)でも免疫反応性を有するペプチドが翻訳されていることが示唆された。本計画の元になったcomposite Mx1がペプチドとして機能していることが強く示唆された。このエクソン3を主な配列とし、イントロンにまでオープンリーディングフレームが延伸する新規のスプライシングバリエーションの配列を決定し、DBJに登録した(LC021361、Terashima and Kawaminami、2015)。

下図はcomposite Mx1の構成を模式的に示したもので、Truncated Mx1 proteinと表記している。エクソン3全配列にイントロンの一部が接合している。新しいポリA付加部位がイントロン中に見つかった。



LC021361は、409bpからなる遺伝子で115アミノ酸残基からなるペプチドを産生する。

つぎに、CRISPR-Cas法を用いたノックアウトマウスの作出を試みた。CRISPR-Cas法によるノックアウトマウスの作出は、共同研究者の松田が担当した。2系統作製され、#25と#19と名付けられた。#25の欠落部位（ハイフン）と野生型の相当する配列（下線）を示す。

#25

GATTCTGTGAATAATCTG--CAGGCACT
ATGAGGAGAAGGTGCGGCCCTGTATT
GACCTC

Wild

GATTCTGTGAATAATCTGTGCAGGCAC
TATGAGGAGAAGGTGCGGCCCTGTAT
TGACCTC

順調に作製に成功し、現在形質解析を行っている。産仔数、成長などに顕著な違いは見られていない。完全にMx1を発現しない動物であることから、免疫組織化学法でネガティブコントロールとして用いることが出来、Mx1の特異的検出が信頼性高く可能となっている。偽遺伝子から作られる長いmRNAとスプライシングによってエクソン3から作られる composite Mx1 mRNAの組織による発現割合を検索することによって、これら2つのペプチドの合成調節が行われていることが明らかになった。

本研究の結果の概要は以上の如くで、遺伝子改変動物については解析が始まったばかりで有り、現在も継続している。Composite exonについて、発現調節を含めて現在論文を準備中である。

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 4件)

Yonezawa T, Watanabe A, Kurusu S, Kawaminami M.
Gonadotropin-releasing hormone is prerequisite for the constitutive expression of pituitary annexin A5. *Endocrine J* 62(12) 1127-32, 2015 DOI: 10.1507 査読有

Laoharatchathanin T, Terashima R, Yonezawa T, Kurusu S, Kawaminami M. Augmentation of Metastin/Kisspeptin mRNA Expression by the Proestrous Luteinizing Hormone Surge in Granulosa Cells of Rats: Implications for Luteinization1. *Biology of Reproduction* 93(1):15 1-9, 2015 DOI: 10.1095 査読有

〔学会発表〕(計 23件)

Kawaminami M, Fungbun N, Terashima R, Kurusu S, Brachvogel B, Pöschl E. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) stimulation of LH release by the pituitary gland depends on annexin A5 (ANXA5) of gonadotropes. 8th International Conference on Annexins マーストリヒト (オランダ) 2015/9/11

Uchida M, Sakai K, Yonezawa T, Kawaminami M. Down-regulation of Annexin A5 (ANXA5) expression in canine mammary tumor cells and the possibility of therapeutic application of ANXA5. 8th International Conference on Annexins マーストリヒト (オランダ) 2015/9/11

Terashima R, Laoharatchathanin T, Kurusu S, Ernst Pöschl, Bent Brachvogel, Kawaminami M. Involvement of annexin A5 in GnRH-stimulated gonadotropin secretion in rat. The Endocrine Society's 97th Annual Meeting San Diego (USA) 2015/3/7

Yonezawa T, Kodama S, Ichinose R, Ohata M, Kurusu S, Kawaminami M. Effects of gonadotropin releasing hormone on courtship behavior and chemoattractants release into the urine of female mice. The Endocrine Society's 96th Annual Meeting Chicago(USA) 2014/6/23

Terashima R, Laoharatchathanin T, Kurusu S, Ernst Pöschl, Bent Brachvogel, Kawaminami M. GnRH

Stimulation of Nr4a3 (NOR1) mRNA expression in LbT2 gonadotropes, a gene augmented in the anterior pituitary gland of Annexin A5 knockout mouse (Anxa5KO) and suppression of FSHb expression by Nr4a3. The Endocrine Society's 96th Annual Meeting Chicago(USA) 2014/6/23

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：抗癌剤及び癌の診断キット
発明者：汾陽光盛、米澤智洋
権利者：汾陽光盛
種類：特許
番号：(特願 2015-160409)
出願年月日：2015年8月17日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www2.vmas.kitasato-u.ac.jp/physiology/Lab_of_Vet_Physiology/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

汾陽 光盛 (KAWAMINAMI, Mitsumori)
北里大学・獣医学部・教授
研究者番号：00153007

(2) 研究分担者

松田 潤一郎 (MATSUDA, Junichiro)
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・研究リーダー
研究者番号：60181731