

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659505

研究課題名(和文) PWSにおける食欲亢進および性格異常の原因分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism responsible for psychiatric characteristics of PWS patients

研究代表者

弟子丸 正伸 (DESHIMARU, Masanobu)

福岡大学・理学部・准教授

研究者番号：70309889

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)：マウスES細胞ゲノム上のMBII-52 snoRNA遺伝子クラスターを改変するため、1回の相同組換えにより標的領域両端への2つのlox配列因子の挿入を試みた。しかしながら、期待される組換えを生じたES細胞クローンは得られなかった。これは、2つの挿入部位間の距離が約100kbと長大であるため、一般的な手法による相同組換えが困難だったためと考えられた。今後は、2つのターゲティングベクターを個別にES細胞ゲノムに作用させ、目的とする相同組換えを生じたクローンを作製する。さらに、MBII-52遺伝子の反復回数を変更した複数種の変異マウスを作製し、行動学的および生化学的解析を実施する予定である。

研究成果の概要(英文)：In order to modify MBII-52 snoRNA gene cluster on the genome of mouse ES cell, several attempt were made to insert two lox elements into the respective ends of the targeted region by use of a single targeting vector. However, no ES cell clone with expected recombination was obtained, probably because of the long distance (~100 kb) between these two sites, and it seems difficult to achieve desirable recombination on this gene cluster with the standard targeting strategy. Additional targeting experiment is currently ongoing using two vectors which interact independently with the two targeted sites. Consequent recombinant ES cells will be used for production of mice in which the number of MBII-52 gene repeat is manipulated, which are to be subjected to behavioral and biochemical analyses.

研究分野：生物化学

キーワード：転写後修飾 snoRNA

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

PWS 患者において欠失が見られるヒト染色体領域15q11-13には、多数の遺伝子が存在している。これと相同な染色体領域の遺伝的刷込み制御領域を標的破壊したマウスはPWSの疾患モデルとして有用であるが、多数の遺伝子の発現が欠如しているため、個々の遺伝子の欠失とPWSの各症状との相関関係は解明できなかった。ヒト15q11-13の遺伝子産物のうち、HBII-52 snoRNAはHTR2CのmRNA前駆体と対合して選択的スプライシングおよびRNA編集の効率を調節し、伝達能力の異なる受容体アイソフォームの発現に寄与することが示された。一方、精神疾患患者の脳における知見から、HTR2C mRNAの適切な編集が正常な情動制御に必須であることが示されている。また、食欲を促すアシルグレリンの血中濃度はHTR2Cを介した信号伝達と逆相関していることが示された。以上の報告を踏まえ、申請者は「PWSの症状のうち、性格異常と食欲亢進はHBII-52 snoRNAの欠如に起因する」という仮説の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Prader-Willi 症候群(PWS)の四徴のうち、性格異常と食欲亢進の原因分子機構の解明である。PWSは、染色体領域15q11-13に含まれる多数の遺伝子の欠失が複合的に異常を引き起こした状態と言える。そのうち、本研究ではHBII-52-snoRNA遺伝子に着目した。HBII-52 snoRNA はセロトニン2C型受容体(HTR2C)の mRNA の成熟に関与するとされ、申請者は、PWS患者における「HBII-52 snoRNAの欠損→HTR2Cの機能不全→情動障害、アシルグレリンの血中濃度上昇→食欲亢進」という分子-病態相関を想定した。この仮説を、HBII-52 ホモログの遺伝子に変異導入したマウスの作製と解析により、証明することを目指した。

3. 研究の方法

当初、本申請の研究内容は、以下の4つのセクションに分割された。

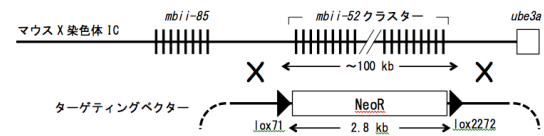
- I. MBII-52 変異マウス(ノックアウトおよび3種のノックイン)の作出
- II. MBII-52 変異マウスにおけるHTR2Cおよびアシルグレリンの分子動態の解析
- III. MBII-52変異マウスの表現型解析
- IV. 総括およびPWS疾患モデルとしてのMBII-52変異マウスの評価

4. 研究成果

平成 24-26 年度の研究期間には、上記のうち I に関する実験操作を行うに留まった。

(1) マウス ES 細胞ゲノム上の MBII-52 遺伝子クラスター領域の標的組換え後に MBII-52 遺伝子の反復回数をさまざまに改変した動物を作製するため、同遺伝子クラスター領域を抗生物質耐性遺伝子で置換し、さらにその両端に後のカセット置換を容易

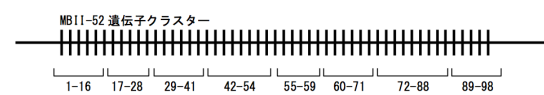
にするための lox 配列を導入した ES 細胞の作製を試みた。遺伝子組換え操作の反復による ES 細胞の劣化を鑑み、一段階で組換えを行うためのターゲティングベクター(下図)を構築した。



このベクターマウス ES 細胞 1.0×10^8 個を導入し、抗生物質 G418 存在下で 8 日間培養し、生じた細胞コロニー 192 個を単離した。これらの細胞から抽出したゲノム DNA を試料に用い、PCR およびサザンブロット解析により期待される組換えが生じたクローンの選別を行った。その結果、いずれのクローンにおいても期待した相同組換えは見出されず、非相同組換えによるベクターの挿入により抗生物質耐性を獲得したことが明らかになった。同様の試行は 5 回行ったが、いずれにおいても期待した相同組換えが生じた細胞クローンは得られなかった。これは、標的とするゲノム領域が約 100 kb と長大であるのに対し、組換えアーム間が約 2.8 kb のターゲティングベクターでは標的領域の両端に効率よく作用できなかったためと考えられた。そこで、現在はターゲティングベクターを MBII-52 遺伝子クラスターの 5' 側と 3' 側を標的とする 2 つに分割し、それらを順次もちいた 2 回の導入操作と異なる抗生物質耐性による選別による組換え細胞の作製を目指している。

(2) 変異カセットの構築に用いる MBII-52 遺伝子クラスターのクローニング

(1) の組換えによりアクセプター細胞を作製した後、2 つの lox 配列間の特異的組換えにより、MBII-52 遺伝子の反復回数のさまざまに異なる変異カセットを挿入した動物を作製する計画である。そのため、変異カセットの構築にもちいる MBII-52 遺伝子クラスターのクローニングを行った。クラスターを便宜上 7-18 kb の 8 つのセグメントに分割し(下図)、各々の両末端に設計したプライマーを用いた PCR により各ゲノム配列の増幅を試みた。



その結果、これまでに 6 つの断片の増幅に成功しそれぞれクローニングしたが、42-54 および 72-88 領域については得られていない。これは、これらの領域の末端部分の塩基配列がクラスター内の反復配列を含んでいるためと考えられ、今後は再設計したプライマーを用いてクローニングを目指す。さらに、得られた遺伝子断片を用いて変異ベクターの

構築を行う予定である。

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6件)

One-pot synthesis of dibenzo[b,h][1,6] naphthyridines from 2-acetylaminobenzaldehyde: application to a fluorescent DNA-binding compound. Okuma K, Koga T, Ozaki S, Suzuki Y, Horigami K, Nagahora N, Shioji K, Fukuda M, Deshimaru M. *Chem Commun (Camb)*. **50**, 15525-15528 (2014) 査読あり.

Structural analysis and characterization of new small serum proteins from the serum of a venomous snake (*Gloydius blomhoffii*). Shioi N, Deshimaru M, Terada S. *Biosci Biotechnol Biochem*. **78**, 410-419 (2014) 査読あり.

The kick-in system: a novel rapid knock-in strategy. Tomonoh Y, Deshimaru M, Araki K, Miyazaki Y, Arasaki T, Tanaka Y, Kitamura H, Mori F, Wakabayashi K, Yamashita S, Saito R, Itoh M, Uchida T, Yamada J, Migita K, Ueno S, Kitaura H, Kakita A, Lossin C, Takano Y, Hirose S. *PLoS One*. **9**, e88549 (2014) 査読あり.

Improved design of hammerhead ribozyme for selective digestion of target RNA through recognition of site-specific adenosine-to-inosine RNA editing. Fukuda M, Kurihara K, Yamaguchi S, Oyama Y, Deshimaru M. *RNA*. **20**, 392-405 (2014) 査読あり.

Accelerated evolution of fetuin family proteins in *Protobothrops flavoviridis* (habu snake) serum and the discovery of an L1-like genomic element in the intronic sequence of a fetuin-encoding gene. Tanaka Y, Oyama S, Hori S, Ushio K, Shioi N, Terada S, Deshimaru M. *Biosci Biotechnol Biochem*. **77**, 582-590 (2013) 査読あり.

A strategy for developing a hammerhead ribozyme for selective RNA cleavage depending on substitutional RNA editing. Fukuda M, Kurihara K, Tanaka Y, Deshimaru M. *RNA*. **18**, 1735-1744 (2012) 査読あり.

[学会発表](計18件)

A-to-I RNA 編集阻害剤の構築を目指した化合物スクリーニング 尾村美樹、弟子丸正伸、佐藤慎一、福田将虎 尾村美樹、弟子丸正伸、福田将虎 第37回日本分子生物学会年会(2014年11月26日、神奈川県横浜市)

細胞内 A-to-I RNA 編集と転写の関係 野瀬可那子、中川裕之、弟子丸正伸、福田将虎 第37回日本分子生物学会年会(2014年11月

26日、神奈川県横浜市)

A-to-I RNA 編集パターンを制御する HTR2C RNA の構造的要因の解明 小山唯、加藤卓、弟子丸正伸、福田将虎 第36回日本分子生物学会年会(2013年12月4日、兵庫県神戸市)

マウス脳 HTR2C mRNA における 2'-O-メチル化が A-to-I 編集に及ぼす影響 大蔵一聡、山口彰太、福田将虎、弟子丸正伸 第36回日本分子生物学会年会(2013年12月4日、兵庫県神戸市)

Alu 配列の A-to-I RNA 編集における ADAR アイソフォームの異なる作用 渋谷圭介、加藤卓、福田将虎、弟子丸正伸 第36回日本分子生物学会年会(2013年12月4日、兵庫県神戸市)

細胞を基盤とした RNA 編集阻害剤スクリーニング方法の開発 尾村美樹、弟子丸正伸、福田将虎 第86回日本生化学会大会(2013年9月13日、神奈川県横浜市)

RNA 編集が誘起する HTR2C mRNA の構造変化と編集パターンの関係 小山唯、加藤卓、福田将虎、弟子丸正伸 第86回日本生化学会大会(2013年9月13日、神奈川県横浜市)

Alu 配列の A-to-I 編集における ADAR アイソフォームの異なる作用 田中泰圭、川副美鈴、渋谷圭介、加藤卓、福田将虎、弟子丸正伸 第15回日本 RNA 学会年会(2013年7月24日、愛媛県松山市)

細胞を基盤とした RNA 編集阻害剤スクリーニング方法の開発 尾村美樹、弟子丸正伸、福田将虎 第15回日本 RNA 学会年会(2013年7月24日、愛媛県松山市)

標的遺伝子発現を抑制する box C/D 型 snoRNA の構築 川本崇仁、小山唯、弟子丸正伸、福田将虎 第15回日本 RNA 学会年会(2013年7月25日、愛媛県松山市)

HTR2C pre-mRNA の構造と A-to-I 編集の関係 小山唯、加藤卓、弟子丸正伸、福田将虎 第15回日本 RNA 学会年会(2013年7月25日、愛媛県松山市)

Alu 配列の A-to-I RNA 編集における ADAR アイソフォームの異なる作用 渋谷圭介、加藤卓、福田将虎、弟子丸正伸 平成25年度日本生化学会九州支部例会(2013年5月19日、佐賀県佐賀市)

セロトニン 2C 型受容体 mRNA の編集に snoRNA MB11-52 が及ぼす影響 山口彰太、福田将虎、弟子丸正伸 平成25年度日本生化学会九州支部例会(2013年5月19日、佐賀県佐賀市)

RNA 編集が誘起する HTR2C mRNA の構造変化と編集パターンの関係 小山唯、加藤卓、福田将虎、弟子丸正伸 平成25年度日本生化学会九州支部例会(2013年5月19日、佐賀県佐賀市)

Construction of the functional RNAs for regulating the site-specific RNA editing. Fukuda M, Kurihara K, Deshimaru M. Gordon Research Conference on RNA Editing

(Galveston, TX USA. Jan. 6-11, 2013).

HTR2C mRNA の RNA 編集パターンに影響を及ぼす cis 因子の解明 小山唯、福田将虎、弟子丸正伸 第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月、福岡県福岡市)

セロトニン 2C 型受容体 mRNA の編集における ADAR2 の標的部位特異性 加藤卓、田中泰圭、福田将虎、弟子丸正伸 第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 13 日、福岡県福岡市)

人工リボザイムを用いた RNA 編集依存的な遺伝子発現制御法の開発 栗原圭、弟子丸正伸、福田将虎 第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 13 日、福岡県福岡市)

標的遺伝子発現を抑制する核小体低分子 RNA の構築 川本崇仁、小山唯、弟子丸正伸、福田将虎 第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 13 日、福岡県福岡市)

機能性 RNA による RNA 編集制御方法の開発 福田将虎、栗原圭、弟子丸正伸 第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 13 日、福岡県福岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

5. 研究組織

(1) 研究代表者

弟子丸正伸 (DESHIMARU, Masanobu)

福岡大学・理学部・准教授