

機関番号：23903

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500376

研究課題名 (和文) 胎生期致死を示す糖鎖関連遺伝子の機能解析系の開発

研究課題名 (英文) Development of the analysis system for the function of glycosylation-related genes involved in embryonic lethality

研究代表者

三好 一郎 (MIYOSHI ICHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10183972

研究成果の概要 (和文)：

内在性グルコシルセラミド合成酵素(Ugcg)遺伝子の両アリルをダブルノックアウトした ES細胞に相同遺伝子を導入し,完全欠損から過剰発現までUgcg発現のに基づく遺伝子機能解析系の樹立を試みたが,安定なクローンは得られなかった。一方,Cre/loxP組換え系により任意の発生段階や組織(細胞)でエクソン5を欠損するセラミド細胞内選択輸送タンパク質(Ceramide Transfer Protein: Cert)コンディショナルノックアウトマウスの樹立に成功した。このマウスは,胎生期致死を示す糖鎖関連遺伝子の新たな機能解析系として有用である。

研究成果の概要 (英文)：

We attempted to establish the analysis system for the function of Ugcg(UDP-Glucose Ceramide Glucosyltransferase) gene on the basis of the quantitative difference, from complete deficiency to overexpression, in the expression of homologue gene introduced into Ugcg-deficient ES cell on both alleles. However, stably transfected clone was not obtained. We generated Ceramide Transfer Protein (Cert) conditional knockout mice deficient in exon5 by using the Cre-LoxP system. As Cert proved to be an essential gene for mouse development and embryonic survival, this mice is a new model useful for the study of the function of glycosylation-related genes involved in embryonic lethality.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：糖鎖, 遺伝子, 発生分化, 実験動物学, セラミド細胞内選択輸送タンパク質

1. 研究開始当初の背景

グルコシルセラミド合成酵素(Ugcg)は数百にも及ぶスフィンゴ糖脂質(GSLs)分子合成系の最も重要な酵素の一つで,セラミドにグルコースを転移する最初の過程を担う。一方,セラミドを小胞体からゴルジ体へ特異的

に輸送するセラミド細胞内選択輸送タンパク質(Ceramide Transfer Protein: Cert)も, Ugcgと同様にGSLsの合成過程で重要な機能を持つ。GSLsはコレステロール等とクラスター状に密集したラフト(あるいはマイクロドメイン)を形成して細胞間相互作用の介

在因子として、あるいは、細胞膜におけるシグナル伝達系の調整因子としての機能が示唆されている。我々のグループでは、Ugcg 遺伝子をノックアウトしたマウスホモ接合体が胎生致死であることを明らかにした。胎性外胚葉の内層細胞に広範なアポトーシスが見られることから、同酵素の欠損、そして GSLs の合成阻害が急速な細胞増殖時の障害になったと推測された。しかしながら、この現象は単一の細胞培養系では証明できておらず、GSLs の欠損と個体レベルでの細胞のアポトーシスの関係、さらに胚や組織の形態形成異常への機序などは明確になっていない。Ugcg 発現トランスジェニックマウスの交配によるレスキューやコンディショナルノックアウトマウス (CKOM) による解析では、小腸上皮などの特定の細胞の異常や欠損・脱落が示され、この酵素が発生初期だけでなく個体の維持に不可欠であることは明白となったものの、依然としてその機構自身は判っていない。この問題を克服する方法として、遺伝子の完全欠損 (ホモ接合体) が胎生期致死に至るにもかかわらず、野生型に比較して顕著な表現型を示さないヘテロ接合体よりも Ugcg 発現量が少ないモデル、また、Ugcg 発現の定量的な差異を基盤に表現型を比較できる系が有用と考えた。Cert も GSLs の合成過程で重要であることから、その欠損が胎生期致死を導くことが予想されたが、培養細胞の解析では顕著な異常が観察されないため個体レベルでの検証が求められていた。

2. 研究の目的

遺伝子 (産物) の機能を解明するためにノックアウトマウス (KOM) による個体レベルの研究は必須である。しかしながら、かなりの比率 (例えば糖鎖関連遺伝子の場合には報告の 30% に及ぶ) で遺伝子の完全欠損が胎生期致死にもかかわらずヘテロ接合体が一見正常に見えることから、その遺伝子が不可欠であるにも関わらず具体的な機能の解析は容易でない。遺伝子の完全欠損が細胞死に至る場合には、コンディショナルジーンターゲティング法でさえ表現型の定性的追跡の範疇から逸脱できないことが多い。この問題を克服する方法として、本研究では、内在性遺伝子を排除したダブルノックアウト (DKO) ES 細胞に相同 (の機能を持つ) 遺伝子を導入し、機能の発現を導入遺伝子に限定することにより、発現量の定量的差異にもとづいて遺伝子の機能を解析できる実験系の樹立を試みた。この実験系は、すべての発生段階で、且つ異所性発現も含めたあらゆる組織での発

現 (制御) を利用し、ES 細胞から分化誘導した細胞レベル、更に個体レベルまで相互に関連づけて検索することにより、胎生期に欠損する (発現しない) ことが原因で個体が死に至る遺伝子の機能を詳細且つ包括的に解明する試みであり、Ugcg 遺伝子を用いてその有用性を示す。一方、胎生期致死を示す糖鎖関連遺伝子の新規機能解析系候補として Cre/loxP 組換え系により任意の発生段階や組織 (細胞) でエクソン 5 を欠損する Cert コンディショナルノックアウトマウス (Cert CKOM) の樹立を試みた。

3. 研究の方法

(1) Ugcg DKO-ES 細胞の樹立

Ugcg 遺伝子のエクソン 6-8 に相同遺伝子組換えを施した ES 細胞を用い、ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ Ugcg 遺伝子ターゲティングベクターにより、もう一方のアリルに相同遺伝子組換えを導入し DKO-ES 細胞を樹立した。

(2) 様々な Ugcg 発現クローンの樹立

次に、その細胞に数種の遺伝子 (CAG-loxP-Ugcg cDNA-IRES-薬剤耐性 ECFP 融合遺伝子-転写終結シグナル-loxP-EYFP、及び、CAG-loxP-薬剤耐性 ECFP 融合遺伝子-転写終結シグナル-loxP-rtetR/VP16AD-IRES-EYFP、TRE プロモーター-loxP-薬剤耐性 ECFP 融合遺伝子-転写終結シグナル-loxP-UgcgcDNA-IRES-EGFP) を導入してクローンを樹立した。

(3) Cert CKOM の樹立

ターゲティングベクターは Cert 遺伝子のエクソン 5 の 5' 側 363 残基上流および 3' 側 2404 残基下流に loxP 配列、さらに、その間のエクソン 5 の 3' 側 314 残基下流に約 2 kbp の FRT 配列に挟まれたネオマイシン耐性遺伝子 (PGK-Neo カセット)、また、両側の loxP 配列からそれぞれ約 6 kbp (5' 側) 及び、約 4 kbp (3' 側) のホモロジーアームを配置した全長約 14 kbp から成る (図 1, 図 2)。常法により ES 細胞 (C57BL/6 系) で標的遺伝子組換え体を作成し、レシーピエント 8 細胞期胚に注入して得られた子孫から C57BL/6Cr (日本 SLC) との交配によって Cert 標的遺伝子組換えマウスホモ接合体を作製して系統として維持した。

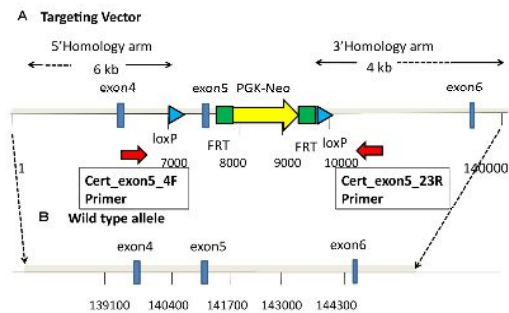


図 1. Cert の標的遺伝子組換え

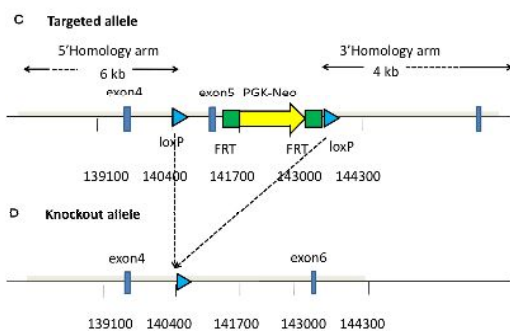


図 2. Cre 酵素によるエクソン 5 の欠失

(4) Cre 酵素による Cert ノックアウトマウス (Cert KOM) の作製

過排卵処理した C57BL/6Cr のメスから回収した未受精卵と Cert 標的遺伝子組換えマウスヘテロ接合体 (HtZ) のオスの精子を採取し体外受精を行った後に、その雄性前核にマイクロインジェクションにより pCAG-Cre プラスミド溶液 (4ng/μl) を 1~2 pL 注入した。翌日 2 細胞期胚に分化した受精卵を選別して偽妊娠 ICR メスマウスの卵管内に移植し、得られたマウスの遺伝子型から Cert ノックアウトヘテロ接合体 (Cert KOM HtZ) を選抜し、以降 C57BL/6Cr との交配により系統を維持した。全ての動物実験は、名古屋市立大学動物実験規程に従って実施された。

4. 研究成果

(1) Ugcg DKO-ES 細胞の樹立と Ugcg 発現クローンの作製

Ugcg 遺伝子の両アリルをノックアウトし、遺伝子発現のない DKO-ES 細胞を樹立した。しかしながら、その細胞に数種の遺伝子を導入したが安定なクローンが得られなかった。用いた Ugcg cDNA に変異が検出されたため、遺伝子を再度構築して試みたものの、現時点では安定に導入遺伝子を発現するクローンが得られず、原因を解明する必要がある。

完全欠損から過剰発現まで Ugcg 発現の定量的差異に基づく遺伝子機能解析系の樹立

する目的で、内在性 Ugcg 遺伝子 DKO-ES 細胞に相同遺伝子を導入したものの、残念ながら Cre/loxP 組換え系あるいは薬物誘導発現系、蛍光タンパクによる可視化を目的とする安定なクローンは得られなかった。個体レベルでの遺伝子機能解析には、その完全欠損から過剰発現まで定量的概念を基盤にした比較が必要とされ、特に遺伝子の完全欠損が細胞死や胎生期致死にもかかわらずヘテロ接合体が一見正常に見える場合は、野生型より低発現のモデルが求められる。この点は、CKOM でも十分とは言えず、依然として今回のような試みが必要と思われる。

(2) Cert CKOM の樹立

キメラマウスと C57BL/6Cr との交配によって安定に組換えアリルを伝達する子孫が得られた。この Cert 標的遺伝子組換えマウスは、外観だけでなく繁殖能力も正常であった。Cert_exon5_4F および Cert_exon5_23R プライマーで PCR 反応を行った場合、野生型アリルは 1033 bp、Cert 標的遺伝子組換えアリルは 3294 bp の標的遺伝子が増幅される。PCR の結果、野生型マウスは 1033 bp (図 3 の A①), Cert 標的遺伝子組換えマウスホモ接合体 (HmZ) は 3294 bp のバンド (図 3 の A②) が検出された。

(3) Cert ノックアウトマウスホモ接合体 (Cert KOM HmZ) は胎生致死である

Cert 標的遺伝子組換えマウスオスと C57BL/6 メスから体外受精によって作製された 228 個の前核期受精卵の雄性前核に pCAG-Cre をマイクロインジェクションし、得られた 47 匹のうち 1 匹に Cre 酵素の組換えによる Cert KOM HtZ が確認された。この個体も外観に異常は見られず繁殖能力も正常であったことから、C57BL/6Cr と交配を実施し系統化した。Cert_exon5_4F および Cert_exon5_23R プライマーで PCR 反応を行った場合、Cert ノックアウトアリルは 323 bp の標的遺伝子が増幅される。PCR の結果、Cert KOM HtZ は 323 bp と 1033 bp (図 3 の B⑥), Cert KOM HmZ は 323 bp (図 3 の B④) のバンドが増幅され、Cert 標的遺伝子組換えと異なるアリルが認められた。

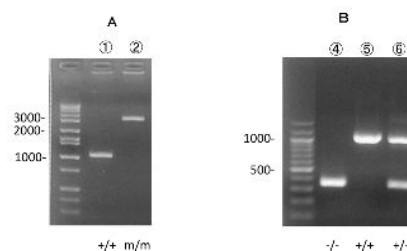


図 3. Cert ノックアウトマウスの遺伝子型

Cert KOM HtZ 同士を掛け合わせ Cert KOM HmZ の作製を試みた(表 1)。母親マウス 3 匹から得られた仔マウス 12 匹のうち、野生型マウスは 3 匹, Cert KOM HtZ は 9 匹であった。1 匹の新生仔も得られなかったことから、Cert KOM HmZ は胎生期致死である可能性が示された。

Cert KOM HmZ が胚発生過程のどの時期に死亡するかを明らかにするために胚の観察を行った(表 1, 表 2)。まず、自然交配によるマウス胚の観察を試みたが、膣栓が確認された個体の妊娠率(8 匹中 2 匹)が予想外に低く胎齢 9.5 日および 10.5 日の胚しか観察できなかった(表 1)。胎齢 9.5 日胚は、野生型マウス 4 匹および Cert KOM HtZ 3 匹, Cert KOM HmZ 1 匹であった。野生型マウスと Cert KOM HtZ の大きさあるいは形態的な相違は無かったが、Cert KOM HmZ は、成長が停滞し形態も異常であった。胎齢 10.5 日胚でも、野生型マウス(5 匹)および Cert KOM HtZ (2 匹)だけでなく Cert KOM HmZ が 1 匹検出されたが、胎齢 9.5 日胚同様、成長が停滞し形態も異常を示した。しかしながら、Cert KOM HmZ 10.5 日胚は、心臓の鼓動から生存が確認された。

自然交配では妊娠個体が得難いことから、Cert KOM HtZ 間で体外受精を行い、2 細胞期胚を偽妊娠メスの卵管に移植して胚の発生を観察した。ここでは受精卵を移植した日を胎齢 0.5 日と定め 7.5 日から 11.5 日までの胚、合計 110 個を観察した(表 2)。

表 1 自然交配による Cert ノックアウトマウスにおける胎仔の遺伝子解析

| 自然交配 ステージ | 遺伝子型 | | | 不明** | 合計 | 着床数 | 胎数 |
|--------------|-------|------|-----|------|----|-----|----|
| | ワイルド* | ヘテロ* | ホモ* | | | | |
| 出生 | 3 | 9 | 0 | 0 | 12 | NE* | 3 |
| E 9.5 | 4 | 3 | 1 | 0 | 8 | 8 | 1 |
| E 10.5 | 5 | 2 | 1 | 0 | 8 | 8 | 1 |

表 2 体外受精による Cert ノックアウトマウスにおける胎仔の遺伝子解析

| 体外受精 ステージ | 遺伝子型 | | | 不明** | 合計 | 着床数 | 胎数 |
|--------------|-------|------|-----|------|----|-----|----|
| | ワイルド* | ヘテロ* | ホモ* | | | | |
| E 7.5 | 4 | 11 | 1 | 7 | 23 | 23 | 2 |
| E 8.5 | 7 | 5 | 3 | 5 | 20 | 21 | 2 |
| E 9.5 | 6 | 9 | 4 | 2 | 21 | 21 | 2 |
| E 10.5 | 9 | 15 | 2 | 8 | 35 | 35 | 4 |
| E 11.5 | 3 | 4 | 1 | 3 | 11 | 11 | 2 |

* ワイルド: ワイルドタイプ
ヘテロ: Cert ノックアウトマウスヘテロ接合体
ホモ: Cert ノックアウトホモ接合体
NE: not examine

** 不明: 脱落は観察されたが、胚がなかったもの

胎齢 7.5 日では、いずれの胚にも形態的相違は認められなかった。胎齢 8.5 日および 9.5 日、10.5 日胚は、各々 2 匹および 2 匹、4 匹の妊娠マウスに野生型マウスおよび Cert KOM HtZ が各々 7 匹および 5 匹、6 匹および 9 匹、9 匹および 15 匹であり、形態に相違はなかった。Cert KOM HmZ は各々 3 匹、4 匹、2 匹であり、明らかに前 2 者と異なり成長が停滞し日齢に伴って相違の程度が著しくなった。胎齢 11.5 日胚は、3 匹の妊娠マウスに対して野生型マウスおよび Cert KOM HtZ, Cert KOM HmZ が各々 3 匹および 4 匹、1 匹であった。しか

しながら、Cert KOM HmZ は小さく委縮した変性塊として回収された。

(4) Cert 遺伝子の発現

成体の Cert 遺伝子の発現は、野生型および Cert KOM HtZ の脳および心臓、肺、肝臓、腎臓、筋肉、子宮などの各臓器から RNA を抽出し、Cert エクソン 4-5 のプローブを用いたリアルタイム PCR により定量解析した。各臓器間に見られる発現パターンは同じ傾向を示したが、Cert KOM HtZ の Cert 遺伝子発現量は野生型マウスの約 60% 程度に低下していた。

野生型マウスおよび Cert KOM HtZ, Cert KOM HmZ の 10.5 日胚の Cert 遺伝子発現をエクソン 1-2 およびエクソン 4-5, エクソン 8-9 の特異的プローブを用いて同様に定量、比較した。Cert 遺伝子エクソン 4-5 の発現は、Cert KOM HtZ では野生型マウスの約 70%, Cert KOM HmZ では検出されなかった。一方、野生型マウスと比較してエクソン 1-2 およびエクソン 8-9 の発現量は、Cert KOM HtZ が約 80% と 40%, Cert KOM HmZ が約 60% と 35% であった。

野生型マウスと Cert KOM HtZ の脳および心臓、肺、腎臓、肝臓、筋肉、精巣などの各臓器からタンパク質を抽出し、Anti-Col4a3bp(Cert) (80 ~ 89kD) および Anti-β-Actin(42kD) によるウエスタンブロットングを行った。全臓器とも 80~89kD 付近に 1~2 本のバンドが検出されたが、Cert KOM HtZ は野生型マウスに比べ発現量が半分程度に低下していた。

Cert 遺伝子エクソン 5 をコンディショナルノックアウトする遺伝子組換えマウスを作成し、その個体発生への関与を検討した。Cert および Cert によるセラミド輸送はマウスの個体発生に必須であることを明らかにし、明確な機能ドメインをコードしていないエクソン 5 がその機能発現に重要であることを示した。本研究で作製した Cert 標的遺伝子組換えマウスは、Cre/loxP システムを利用することにより時期および組織特異的に Cert 遺伝子の発現をノックアウトすることができることから、Cert およびスフィンゴ脂質の機能の解析を発展させる新たなモデルである。

以上は、理化学研究所脳科学総合研究センター・平林義雄博士、および大須賀壮博士、国立感染症研究所・花田賢太郎博士、国立国際医療センター研究所・岡村匡史博士との共同研究である。

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5件)

- ① Niimi K, Miyoshi I ら (5/7): Impairment of neuropsychological behaviors in ganglioside GM3-knockout mice. Biochem Biophys Res Commun, 406, 524-528, 2011. 査読有
- ② Niida H, Miyoshi I ら (12/17): Cooperative functions of Chk1 and Chk2 reduce tumour susceptibility in vivo. EMBO J, 29, 3558-3570, 2010. 査読有
- ③ Kojima T, Miyoshi I ら (5/7): Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. Stem Cells, 28, 545-554, 2010. 査読有
- ④ 三好一郎: モデル動物の開発とその応用. Nagoya Med J, 51(1), 55-61, 2010. 査読無
- ⑤ Katayama Y, Miyoshi I ら (4/6): Rap signaling is crucial for the competence of IL-7 response and the development of B-lineage cells. Blood, 114, 1768-1775, 2009. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

- ① 三好一郎: 動物実験に関わるカルタヘナ法について. 公私立大学実験動物施設協議会第16回シンポジウム(特別講演), 平成22年6月4日, ルビノ京都堀川.
- ② 久野雅広, 三好一郎ら(4/4): セラミド細胞内選別輸送タンパク質(Ceramid transfer protein; Cert)欠損マウスの作製. 東海実験動物研究会, 平成21年9月12日, 名古屋市立大学.

〔図書〕(計1件)

- ① 三好一郎: 発生工学. 笠井憲雪, 吉川泰弘, 安居院高志(編)現代実験動物学. 168-181, 2009. 査読無

〔その他〕

ホームページ等

http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/animal.dir/animalweb/dcem/index_ncu.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 一郎 (MIYOSHI ICHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 10183972