

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790196
 研究課題名（和文）光誘導かつ概日リズム変動型遺伝子の点突然変異遺伝子解析による生物時計機構の解明
 研究課題名（英文）Analysis of circadian clock system by mouse mutagenesis for light inducible and circadian expressed genes.
 研究代表者
 福村 龍太郎 (Fukumura Ryutaro)
 独立行政法人理化学研究所・新規変異マウス研究開発チーム・開発研究員
 研究者番号：90392240

研究成果の概要（和文）：

本研究により、理研 ENU マウスミュータジェネシスライブラリーから光誘導かつ概日リズム変動発現を示す *Snk*, *Slc39a6*, *Dusp4* 遺伝子の 1 アミノ酸置換変異体を合計 7 系統発見した。しかし *Snk* および *Slc39a6* 変異マウスの概日リズム周期は正常で、各変異の概日リズムへの関与は証明できなかった。一方、*Slc39a6* 変異オスマウスは妊性が著しく低下している事を発見し、*Slc39a6* 遺伝子が雄性妊性能に重要な働きを示唆するデータが新たな知見として得られた。

研究成果の概要（英文）：

We obtained 7 mutants for *Snk*, *Slc39a6* and *Dusp4* genes, which are induced by light and oscillated with a circadian rhythm, by RIKEN ENU-based gene-driven mutagenesis system. *Snk* and *Slc39a6* mutant mice were normal with respect to the circadian rhythm by constant dark condition. Therefore, we could not indicate that these mutations are related to a circadian clock system. We however found that the *Slc39a6* mutant male mice were infertile. It is a new finding that the *Slc39a6* gene is related to the male sterility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：概日リズム、マウス ENU ミュータジェネシス

1. 研究開始当初の背景

生物時計研究は、変異生物の研究の歴史であり、ショウジョウバエやマウスなどのモデル系によって大きく発展してきた。先日、報告された生物時計機構を構成する重要分子のひとつである *Clock* 遺伝子のノックアウト

マウスでは、概日リズムの周期性はほぼ正常であった。それまでに報告のあった *Clock* 点突然変異マウスの解析では、概日リズムの周期性は異常を示していた。この 2 つの表現型の違いは、*Clock* 遺伝子の変異タイプ（ノックアウト型とアミノ酸置換型）に依存していることが示唆されており、

1つの変異型解析では理解出来なかった現象が、複数の変異アレルから明らかになった例の1つである。生物時計機構を構成する多くの遺伝子に関して、ノックアウトマウス作製は盛んに行われているが、アミノ酸置換を有する点突然変異マウスの作製や解析例は少ない。

2. 研究の目的

研究代表者は2003年度に高精度遺伝子発現解析法(HiCEP法)を開発し、この手法を用い、哺乳動物生物時計の中核であるSCNで、光刺激により発現誘導され、さらに概日リズムに応じて発現変動する4つの遺伝子(*Dusp4*, *Snk*, *Nnat*, *Slc39a6*)を発見、報告した。光誘導性遺伝子、概日リズム発現変動遺伝子はそれぞれ多くの遺伝子が報告されているが、この2つの性質を併せもつ遺伝子は少なく、代表的な遺伝子としてperiod homolog 1 (*Per1*)があり、生物時計機構の重要分子の1つである。4つの遺伝子中で、*Snk*は細胞周期に関与する分子であるが、脳ではNMDA受容体からの刺激を受け、*SPAR*をリン酸化し、ユビチキン化によるシナプス欠落に関与する分子として知られ、脳において重要な機能が指摘されている。*Dusp4*はMAPキナーゼファミリーであるERK1, 2およびJNKを脱リン酸化し不活化する。MAPキナーゼ経路は光同調機構に関与し、さらにMAPキナーゼ活性自体の日周振動も示されている。*Slc39a6*はZIPトランスポーターに含まれる亜鉛トランスポーターであり、亜鉛は、さまざまな酵素の活性維持に必要な金属元素であり、亜鉛結合モチーフとしてZnフィンガー、Ringフィンガー、LIM、PHDドメインなどの亜鉛結合モチーフの存在が知られている。ZIPトランスポーターは主に細胞外から細胞内部への亜鉛輸送に関わり、細胞内亜鉛ホメオスタシス維持に機能し、アルツハイマー、糖尿病、胚発生、がん転移、免疫などの疾病や生理機能に幅広く機能している事が知られている。しかし、概日リズムとの関連は報告されていない(要確認!!!)。本研究では4遺伝子の中から、*Snk*、*Dusp4*、*Slc39a6*の生物時計機構への関与を検証するため、RIKEN ENU-based gene-driven mutagenesis system(RGDMS)を利用した。2遺伝子の点突然変異スクリーニングを行い、アミノ酸置換やスプライシング異常などの点突然変異を発見した。発見変異は、その個体由来の凍結精子を用い、変異マウスの復元を行った。それら変異マウスの概日リズムを測定し、変異遺伝子による概日リズムおよび光同調機構への影響の有無を検証した。変異マウスで異常が観察された場合、異なる変異アレル間による交配実験、変異型遺伝子導入による細胞レベルでの概日リズム測定実験等から、より詳細に標的遺伝子がどのようなメカニズムで生物時計機構に関与す

るか検討した。

3. 研究の方法

(1) RGDMSを用いた *Snk*、*Dusp4*、*Slc39a6* 遺伝子の変異マウス作製

RGDMSは標的遺伝子上に点突然変異を持つ変異マウスを作製する事が出来る。RGDMSではENU投与されたC56BL/6J雄マウス(G0)と未処理のDBA/2雌マウスを交配させ産ませたDBF1雄マウス(G1)約8,000匹のゲノムDNAと凍結精子を保存し、アーカイブ化している。このG1マウスには、雄親からENU由来点突然変異が1匹当たり約3,000個、遺伝されていると推測されている。したがって、ライブラリー全体ではゲノムDNA上に3,000 x 8,000 = 24,000,000個の点突然変異が存在している。ゲノムDNA中の1%が蛋白質をコードする配列(ORF)と仮定すると、ORF中には、240,000変異が存在する事となる。RGDMSを用いたこれまでの実績から、ORF中に存在する70%の点突然変異がミスセンス変異、10%がノックアウト型変異となるため、ライブラリー全体でそれぞれ168,000、24,000変異が蓄積されていることになる。ゲノムDNAアーカイブを用い、標的遺伝子上にある変異を同定し、凍結精子アーカイブからの個体復元により、標的遺伝子の変異マウスを得る事が出来る。RGDMSマウスDNAアーカイブから*Snk*、*Dusp4*、*Slc39a6*遺伝子上の変異体スクリーニング実施するため、*Snk*遺伝子の第7エクソン、*Dusp4*遺伝子の第1、2、3、4エクソン、*Slc39a6*遺伝子の第7エクソンを増幅するPCRプライマーをマウスゲノム上にそれぞれデザインした。*Snk*、*Slc39a6*遺伝子のスクリーニングはTilling法で実施した。Tilling法は変異箇所を特異的に切断する制限酵素を用いる手法である。8個体のマウスゲノムDNAをプールのスクリーニング用96ウェルDNAプレート9枚(7502個体)をテンプレートとし、各PCRプライマーでPCRを行い、増幅された産物を*CELI*ヌクレアーゼ処理(45°C20分)した。*CELI* Iヌクレアーゼ処理産物を精製後、キャピラリー式電気泳動装置(QIAxcel, QIAGEN)により分析した。PCR産物に変異が無い場合は、電気泳動により元のPCR産物と同じサイズのバンドが検出されるが、変異がある場合、変異カ所が*CELI*ヌクレアーゼにより切断されるため、元のPCR産物よりも短いバンドが検出される。*Dusp4*遺伝子はエクソン内にC57BL/6JマウスとDBA/2Jマウス間のSNPが多数存在しており、Tilling法では解析不可能だった。そのため、変異スクリーニング法にHRM法を用いた。HRM法は2個体のマウスゲノムDNAをプールのスクリーニング用DNA96ウェルプレート36枚(7502個体)をテンプレートとし、各PCRプライマーでPCRを行う。PCRの際に、5nM SYTO9(Invitrogen)を加えた。PCR産物を熱変性処理(98°C20秒、28°C20分)し、HRM解析装置

(LightScanner, Idaho)で融解曲線を計測し、変異サンプルを抽出した。SYTO9は二本鎖DNA特異的に結合し、励起する蛍光試薬である。PCR産物内の変異の有無により融解曲線に変化が生じる

ため、変異サンプルを検出可能となる。各手法ともにプール化したサンプルから変異個体を同定するため、プールしていないマウスゲノム DNA を用い、PCR 後にシーケンス反応を行い、変異同定を行った。変異スクリーニングで発見した変異の中から、*Snk* 遺伝子のミスセンス変異 Tyr268His を持つ M1994、*Slc39a6* 遺伝子のナンセンス変異 Tyr541STOP を持つ M1780 の 2 系統を凍結精子から個体復元した。凍結精子を融解後、C56BL/6J 雌マウスから採取した未受精卵に加え、受精卵を作製し、仮親として ICR 雌マウスに移植、出産させ、産仔 (G2) を得た。G2 マウスの遺伝型は +/+ もしくは +/m となるので、ジェノタイプ検査を実施し、+/m の雌雄を交配させ、野生型 +/+、ヘテロ +/m、変異ホモ m/m 個体 (G3) を得た。

(2) 点突然変異マウスの概日リズム測定

Snk 変異マウス系統 M1994 および *slc39a6* 変異マウス系統 M1780 の G3 雄マウス野生型 +/+、ヘテロ +/m、変異ホモ m/m の各遺伝型 6 匹を用意し、概日リズムを測定した。生後 7 週目に各マウスを 2 週間の明暗条件下 (明期 12 時間、暗期 12 時間) で飼育し、その後、恒暗条件下 (暗期 24 時間) で飼育し、マウスの活動量を測定した。恒暗条件下 10 日目の CT6、20 日目の CT14、30 日目の CT22 に光照射を行い、光同調に対する反応性を測定した。概日リズム測定は、山口大学井上慎一博士との共同研究で行った。

(3) 点突然変異マウスの生殖能力テスト

作製した点突然変異マウスの生殖能力が正常であるか、検証するため、変異ホモ接合 m/m 雌雄 3 組を交配させた。産仔が得られない場合は、C57BL/6J マウスと変異ホモ接合 m/m マウスを交配させ、生殖能力の雌雄における差があるか検証した。

(4) 体外受精による M1780 雄マウスの受精能力検査

slc39a6 変異マウス系統 M1780 雄マウスの精巢上体尾部から精子を M2 培地に懸濁し、37°C、60 分、5%CO₂ 化で培養後、ホルモン投与処理した C57BL/6J 雌マウスから採取した未受精卵と混ぜ、37°C、24 時間、5%CO₂ 化で培養後、実体顕微鏡により 2 細胞胚の数を測定し、精子の受精能力を検討した。

4. 研究成果

(1) RGDMS を用いた *Snk*、*Dusp4*、*Slc39a6* 遺伝子の変異マウス作製

Snk、*Dusp4*、*Slc39a6* 遺伝子の合計 6 エクソン、1774bp に関して 9 つの塩基置換を発見した (表 1)。このうち、6 つがミスセンス変異、1 つがナンセンス変異、残り 2 つがシノニマス変異であった。*Snk* および *Slc39a6* 遺伝子

からは 4 変異が発見出来たが、*Dusp4* 遺伝子からは 1 つのミスセンス変異のみであった。*Snk* および *Slc39a6* 遺伝子における変異発見効率は 49. 8bp、94. 5bp に 1 つと、RGDMS 変異ライブラリーにおける変異発見効率と有意差を示す値では無かったが低かった。*Dusp4* 遺伝子は 1197bp に 1 つと、極端に低い値を示した。この発見率低下は、*Dusp4* 遺伝子では全てのエクソンで 1、2 個の系統間 SNP が存在したため、既存の変異スクリーニング感度では、検出が困難であったためと推測される。発見した変異の中から、生物種間の保存性、アミノ酸組成の変化パターンを考慮し、*Slc39a6* 遺伝子の 541 番目のタイロシンが終止コドンに変化した M1780、*Snk* 遺伝子の 268 番目のタイロシンがヒスチジンに変化した M1994 の 2 系統について、凍結精子を用いて変異マウスに復元した。

(2) 点突然変異マウスの概日リズム測定

Slc39a6 および *Snk* 遺伝子産物が、マウスの概日リズム活動に影響を及ぼすかどうかを検討するため、変異マウスと野生型マウスの概日リズムを測定した。M1780 系統の各遺伝型 (+/+, +/m, m/m) の雄マウスを 6 匹、計測した所、自由継続周期はそれぞれ 23. 78、23. 66、23. 72 時間と有意差は見られなかった (図 1)。続いて、遺伝子産物の光同調機構への影響を調べるため、日中に当たる CT6、日が沈んだ 2 時間後にあたる CT14、日の出の 2 時間前にあたる CT22 にマウスに光照射を与えて、自由継続周期の位相変化時間を計測した。その結果、各ポイントにおける位相変化時間は各遺伝型で有意差は見られなかった (図 2)。M1994 の各遺伝子型でも、自由継続周期と位相変化時間に有意差は見られなかった。この結果から、2 系統の点突然変異マウスを用いた解析からは、*Slc39a6* および *Snk* に発見した変異がマウスの概日リズムを司るメカニズムに関与しているという証明は出来なかった。

(3) M1780 変異ホモマウスの雄性不妊

得られた変異マウスは概日リズム測定前に、目視によって外見や行動に明らかな異常が無いか、検証した。その結果、作製した 2 系統とも、特段、異常は確認されなかった。続いて、生殖能力を調べるため、各系統間で、変異ホモ雌雄 3 組を交配させた所、M1994 では 3 組共に産仔を得られたが、M1780 では、3 組共に産仔を得られなかった。雌雄どちらに原因があるか調べたところ、雌マウスは正常であるが、雄マウスの妊性に有意差が確認された (図 3)。

(4) 体外受精による M1780 雄マウスの受精能力検査
雄性不妊の原因究明のため、M1780 雄マウス精子の受精能力が正常であるか検討した。変異ホモマウス 8 匹、野生型マウス 5 匹から精子を採取し、それぞれ C57BL/6J マウス由来未受精卵と体外受精させた結果、変異ホモと野生型で差は見られたが、有意差は確認出来なかった (図 4)。精子濃度、運動性に関しても、特に差は検出されなかった。以上から精子の受精能力はほぼ正常で、他の要因によ

り不妊症状を示している事が示唆された。マウスの妊性は日照時間と強い相関があり、また概日リズムも光によって強く制御されていることから、この発見は極めて興味深い。今回の研究から、光誘導かつ概日リズム変動を示す *Snk*, *Slc39a6*, *Dusp4* 遺伝子の変異体を合計 7 種類発見した。しかし *Snk* および *Slc39a6* 変異マウスの概日リズム周期は正常で、各変異の概日リズムへの関与は証明できなかった。*Dusp4* 遺伝子に関しては、1 変異体しか発見出来ず、研究期間中に変異マウスを作製する事が出来なかった。近年、次世代シーケンス技術を用いた変異スクリーニング法の解析が進み、*Dusp4* 遺伝子の様に、従来の方法では、発見困難な遺伝子もより効率的に解析可能となる可能性があり、より多くの変異体作製が期待でき、概日リズム研究材料として活用される事が期待される。一方、*Slc39a6* 遺伝子は雄性妊性能に重要な働きを示唆するデータが新たな知見として得られ、今後、雄性妊性能に対する *Slc39a6* 遺伝子の機能解明を進める予定である。

表 1. ENU誘発点突然変異マウスDNAアーカイブより発見した変異

遺伝子	方法	塩基置換	種類	アミノ酸変化	変異ID
<i>Snk</i>	Tilling	T→C	ミスセンス	Tyr268His	M1994
<i>Snk</i>	Tilling	T→A	ミスセンス	Asp323Glu	M2095
<i>Snk</i>	Tilling	A→T	シノニマス		M2096
<i>Snk</i>	Tilling	G→C	ミスセンス	Ala309Pro	M2097
<i>Slc39a6</i>	Tilling	A→G	ミスセンス	Glu510Gly	M1782
<i>Slc39a6</i>	Tilling	T→A	ミスセンス	Met521Lys	M1785
<i>Slc39a6</i>	Tilling	T→C	シノニマス		M1783
<i>Slc39a6</i>	Tilling	T→A	ナンセンス	Tyr541stop	M1780
<i>Dusp4</i>	HRM	T→A	ミスセンス	Leu87Gln	M0883

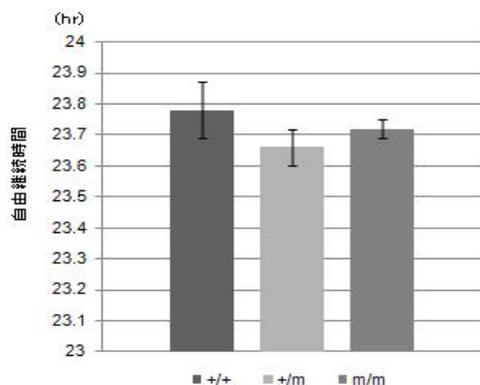


図1 M1780各遺伝子型の自由継続時間

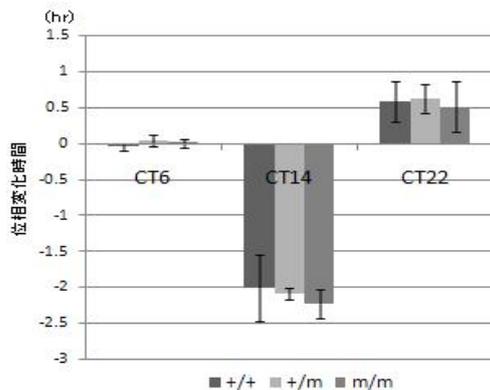


図2 M1780各遺伝子型の光同調による位相変化時間

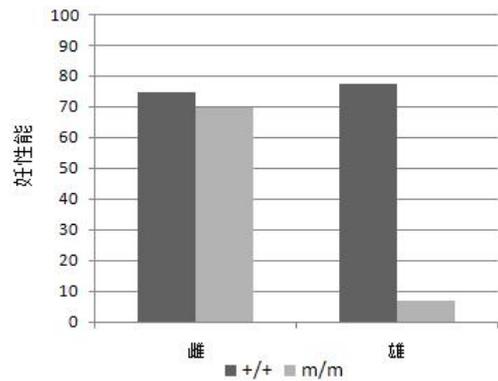


図3 M1780の妊性試験

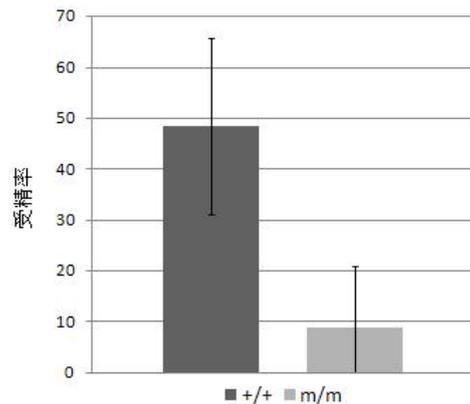


図4 M1780における体外受精による精子受精能試験

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 3 件)

①Gondo Y, Fukumura R (4 名中 2 番目),
Next-generation gene targeting in the mouse for functional genomics., *BMM Rep*, 42, 315-323, 2009, 査読無

②Labrie V, Fukumura R (15 名中 2 番目),
Serine racemase is associated with schizophrenia susceptibility in human and in a mouse model., *Hum Mol Genet*, 18, 3227-3243, 2009, 査読有

③Gondo Y, Fukumura R,
ENU-induced mutant mice for a next-generation gene-targeting system., *progress in Brain Research*, 179, 29-34, 2009, 査読無

[学会発表] (計 2 件)

① Fukumura R
Next-generation gene targeting system based on ENU mutagenesis, 第 32 回 日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 12 日, 日本 横浜.

② Fukumura R,

Evaluation of a massive mutations discovery method by exon enrichment system., International Mammalian Genome Conference, 2009年11月3日, アメリカ、サンディエゴ、.

[図書] (計1件)

- ① 福村龍太郎、エル・アイ・シー「モデル動物利用マニュアル」:ENUマウスミュータジェネシス、印刷中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福村 龍太郎 (Fukumura Ryutaro)

独立行政法人理化学研究所・新規変異マウス
研究開発チーム・開発研究員

研究者番号 : 90392240