

機関番号：11301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790303
 研究課題名（和文） 条件付き小 Maf 群因子欠失マウスを用いた進行性疾患モデルの確立
 研究課題名（英文） Generation of conditional knockout of small Maf genes in mice

研究代表者

勝岡 史城 (KATSUOKA FUMIKI)
 東北大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：30447255

研究成果の概要（和文）：

CNC群因子と小Maf群因子のヘテロ二量体は、生体防御関連遺伝子の発現制御に重要である。小Maf群因子の欠失マウスは胎生致死であるが、その詳細な表現型、小Maf群因子の成獣での機能は十分に解析されていなかった。本研究では、小Maf群因子が胎生中期以降、特に肝臓の発生に必須であることを示した。また、小Maf群因子欠失マウスの示す神経変性が、神経細胞自身の機能障害によることを示した。成獣での機能解析を可能にする条件付き小Maf群因子欠失マウスを作製した。

研究成果の概要（英文）：

CNC-small Maf heterodimers are important for the regulation of various cytoprotective genes. This study revealed that small Maf proteins are indispensable for embryogenesis after E9.5, especially for liver development. This study also showed that the neurodegeneration observed in small Maf mutant mice is cell-autonomous effect. Conditional knockout system of small Maf proteins was established and will enable us to examine the function of small Maf proteins in adult tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：転写因子、疾患モデルマウス、小Maf群因子、生体防御

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種などの酸化ストレスや外来異物に対する生体応答系の破綻は、様々な疾患の発症と密接に関わっている。このような疾患発症を未然に防ぐ目的で、細胞はストレスに対して素早く応答して、その恒常性を維持

している。

塩基性領域-ロイシンジッパー (bZIP) 型転写因子 Nrf2 を含む CNC 因子と小 Maf 群因子 (MafG, MafK, MafF) のヘテロ二量体は、酸化ストレス・異物代謝応答系に関わる一群の生体防御遺伝子を統一的に制御している。申請者らは以前に、小 Maf 群因子三重欠失マ

ウスの胎仔由来の線維芽細胞では、酸化ストレスや異物代謝応答に関わる酵素遺伝子の一群の発現が著明に減少していることを報告し、小 Maf 群因子の生体防御遺伝子の発現制御に必須であること、遺伝学的に証明した。

上記の解析で申請者は、小 Maf 群因子の三重欠失マウスが胎生致死であることを明らかにしていた。しかし、その致死性に関する詳細な表現型、原因となる標的遺伝子は明らかになっていなかった。また、小 Maf 群因子の二重欠損マウスは、進行性の神経変性疾患に似た表現型を示すが、病態発症の分子機序は不明であった。また、小 Maf 群因子の成獣における機能は、三重欠失マウスの致死性のため十分に解明されていなかった。

2. 研究の目的

小 Maf 群因子の欠失がマウス個体に与える影響を、組織学的ならびに分子生物学的に解析し、小 Maf 群因子のストレス応答遺伝子の発現制御に対する貢献を明らかにする。また、小 Maf 群因子変異マウスの表現型を詳細に解析することで、本マウスをヒト疾患のモデルマウスとして捉え、対象となるヒト疾患の病態発症の理解を目指す。

三種類の小 Maf 群因子は、互いの機能を代償する。そのため、二重欠損マウスでは、残存する小 Maf 群因子が十分な機能を発揮するため、小 Maf 群因子の機能貢献の観察されない組織が多い。本申請研究では、成獣の各組織においての小 Maf 群因子の機能を解析する目的で、条件付き小 Maf 群因子欠失マウスを作製する。

3. 研究の方法

(1) 小 Maf 群因子の複合欠失マウスの表現型の解析

小 Maf 群因子 MafG、MafK の二重欠損マウスの示す神経症状の原因を明らかにする目的で、二重欠損マウス由来の神経細胞の初代培養を行った。また、初代培養神経細胞、ならびに脳組織より RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を実施した。神経変性発症の原因が神経細胞自身にあるかを明らかにするため、二重欠損マウス由来神経細胞における変性タンパク質の蓄積をウェスタンブロット法にて解析した。

小 Maf 群因子の胎生期における機能を解明する目的で、小 Maf 群因子三重欠失マウスの致死となる胎齢を精査した。また、三重欠失マウス胎仔の組織学的な解析を行い、発生異常の有無を検討した。胎生致死の原因遺伝子を明らかにする目的で、致死となる週齢の胎仔

より RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を実施した。マイクロアレイのデータは、定量的 PCR 法にて検証した。

(2) 条件付き小 Maf 群因子欠失マウスの作製

申請者らによるトランスジェニックマウスの解析から、MafG 遺伝子上流 6.8kbp、下流 4.8kb のゲノム領域は、マウス個体において内在性の MafG 遺伝子の発現をほぼ再現できることが明らかとなっている。この制御領域を含むトランスジェニック構築に、Cre による組換え配列である LoxP 配列を前後に配置した MafG cDNA を挿入することで、条件付き欠失遺伝子座を含むトランスジェニック構築 (MGRD-FloxMafG) を作製した。これをマウスの受精卵に顕微注射し MGRD-FloxMafG トランスジェニックマウスを作製した。樹立されたマウスの導入遺伝子のコピー数を定量的 PCR で確認し、低コピー数で十分な欠失が期待されるマウスを選択した。さらに、本マウスで外来性の MafG が発現すること、Cre 酵素によって欠失することをウェスタンブロット法にて解析した。本マウスを MafG^{+/+} : MafK^{-/-} : MafF^{-/-} と交配することで、三重欠失マウスの相補レスキューを実施した。本レスキューマウスは、MafG^{+/+} : MafK^{-/-} : MafF^{-/-} : TG-Cre マウスと交配することで、小 Maf 群因子の条件付き欠失マウスの作出を可能にする (図 1)

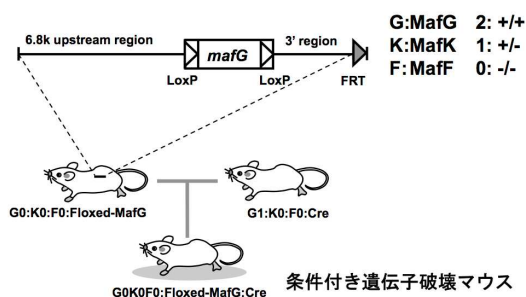


図1 条件付き小Maf群因子欠失マウスの作製方法

4. 研究成果

(1) 小 Maf 群因子二重欠損マウスの胎仔脳を用いて、神経細胞の初代培養を実施した。ウェスタンブロットでユビキチンの蓄積を評価したところ、MafG:MafK 二重欠損マウス神経細胞では、ユビキチン化タンパク質が有意に蓄積していることが明らかとなった。また、同細胞より RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、既存の Nrf2 の標的遺伝子である NAD(P)H キノン酸化還元酵素 (NQO1) などの発現は正常であった。この結果から、神経変性発症に関わる原因遺伝子は、

Nrf2 と小 Maf 群因子の二量体によって制御される標的遺伝子とは異なることが示された。また、小 Maf 群因子欠失による神経変性は、神経細胞自身の機能不全によることが示された。二重欠失マウス成獣脳における遺伝子発現解析では、ヒトの神経変性疾患においても報告されている遺伝子の発現異常が観察された。したがって、同マウスの神経変性とヒト疾患との共通性が示唆された。

小 Maf 群因子三重欠失マウスの致死となる胎齢を詳細に解析した。MafG^{+/-} : MafK^{-/-} : MafF^{-/-} どちらの交配において、三重欠失マウスは、胎生 8.5 日では期待値通りの個体数が得られたが、胎生 9.5 日以降では期待値を下回り、胎生 14.5 日を超えて生存する三重欠失マウスはいなかった。胎生 10.5 日以降の三重欠失マウス個体では、成長遅延が観察され、肝臓の発生が著しく障害されていた (図 2)。

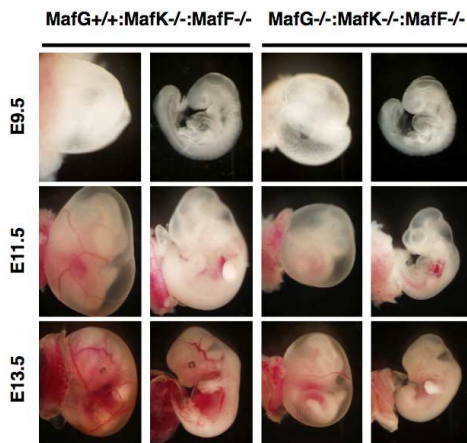


図2 小Maf群因子三重欠失マウスの示めす成長遅延

三重欠失マウスの胎仔肝臓を用いた免疫組織学的な解析では、肝細胞と造血細胞の両方でアポトーシスが観察された。さらに同マウス肝臓では、NQO1 などのストレス応答遺伝子の発現が減少していることが明らかとなった。しかし、胎生 10.5 日の三重欠失マウス個体における遺伝子発現解析では、Nrf2 の標

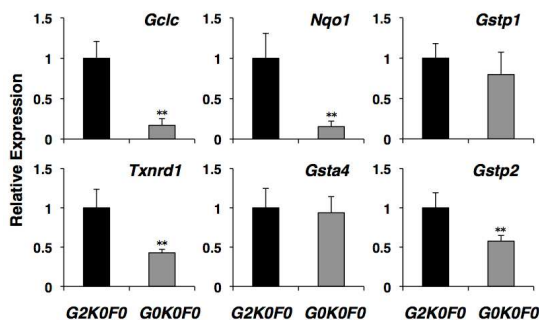


図3 小Maf群因子三重欠失マウス肝臓での遺伝子発現

的である NQO1 などのストレス応答遺伝子は正常レベルで発現していた。以上の結果から、小 Maf 群因子は胎生初期の発生には必須でないことが示された。また、三重欠失マウスの成長遅延は、Nrf2 の標的遺伝子以外の遺伝子の発現異常が関与していることが示された。さらに、小 Maf 群因子は、胎生中期、特に肝の発生に必須であることが示され、この時期における小 Maf 群因子に依存したストレス応答遺伝子の発現の重要性が示唆された。

(2) 条件付き小 Maf 群因子欠損マウス作製する目的で、MGRD-FloxMafG トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックのコピー数を確認し、十分な欠失が期待される 4 コピーの MGRD-FloxMafG トランスジェニックマウスを得た。本マウスにおける外来性 MafG は、内在性の MafG のおよそ 4 倍程度発現し、Cre 発現マウスとの交配によって欠失することを確認した。本トランスジェニックマウスを MafG^{+/-}:MafK^{-/-}:MafF^{-/-} と数世代交配し、相補レスキューを実施した。その結果、三重欠失でかつ、MGRD-FloxMafG トランスジェニックを持つレスキューマウスが出生することを確認した。本申請研究では、低コピー数の MGRD-FloxMafG マウスの作出に時間を要したため、Cre マウスとの交配による条件付き遺伝子欠損マウスの作出と、その表現型の解析には至らなかった。しかし、今後、本マウスを各種 Cre マウスと交配することで、成獣の各組織における小 Maf 群因子の機能解析が可能になると期待される。

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)

1. Akira Kobayashi, Takako Tsukide, Tomohiro Miyasaka, Tomoko Morita, Tatsuya Mizoroki, Yoshiro Saito, Yasuo Ihara, Akihiko Takashima, Noriko Noguchi, Akiyoshi Fukamizu, Yosuke Hirotsu, Makiko Ohtsuji, Fumiki Katsuoka, Masayuki Yamamoto. Central nervous system-specific deletion of transcription factor Nrf1 causes progressive motor neuronal dysfunction. 査読有、Genes Cells 印刷中 (2011)
2. Yosuke Hirotsu, Fumiki Katsuoka, Ken Itoh, and Masayuki Yamamoto. Nrf2 degron-fused reporter system; a new tool for specific evaluation of Nrf2 inducers. 査読有、Genes Cells 16, 406-415 (2011)

3. Hozumi Motohashi, Rie Fujita, Mariko Takayama, Ai Inoue, Fumiki Katsuoka, Emery H. Bresnick, Masayuki Yamamoto. Molecular determinants for small Maf protein control of platelet production. 査読有、Mol Cell Biol. 31,151-162 (2011).
4. Hozumi Motohashi, Momoko Kimura, Rie Fujita, Ai Inoue, Xiaoqing Pan, Mariko Takayama, Fumiki Katsuoka, Hiroyuki Aburatani, Emery H. Bresnick, Masayuki Yamamoto. NF-E2 domination over Nrf2 promotes ROS accumulation and megakaryocytic maturation. 査読有、Blood. 115,677-689 (2010)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 弘津陽介, 勝岡史城, 小林聡, 山本雅之. 転写因子 Nrf1 と Nrf2 の中枢神経系における機能的差異の検証. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会学会年会. 2010 年 12 月 9 日 神戸
2. Hiromi Yamazaki, Fumiki Katsuoka, Hozumi Motohashi, James Douglas Engel, Masayuki Yamamoto. Embryonic lethality and fetal liver hypoplasia in mice lacking all three small Maf proteins. 9th JBS Bio-Frontier Symposium 2010-5th International symposium of GATA factors. 2010 年 11 月 17 日 仙台
3. Fumiki Katsuoka. Molecular basis of CNC and small Maf dimer function in neural tissues. Jornada Científica Regulatory mechanisms in inflammatory processes. University of Valencia, 2010 年 10 月 15 日 スペイン、バレンシア
4. 弘津陽介, 勝岡史城, 山本雅之. Comprehensive analysis of gene expression in central nervous system of small Maf compound mutant mice. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 12 日 横浜
5. 勝岡史城, 中山博未, 本橋ほづみ, 山本雅之. Nrf2 is degraded by Keap1-independent proteasome pathway in the absence of small Maf proteins. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年

12 月 10 日 横浜

6. Katsuoka F, Motohashi H, Nakayama H, Yamamoto M. Pivotal roles of small Maf proteins in the regulation of stress response genes. The 1st International Symposium “Challenge to Medical Innovation” 2009 年 12 月 7 日 仙台
7. Katsuoka F, Motohashi H, Nakayama H, Yamamoto M. Nrf2 is degraded by Keap1-independent degradation pathway in the absence of small Maf proteins. 21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, 2009 年 10 月 26 日 東京
8. 中山博未, 勝岡史城, 本橋ほづみ, 山本雅之. マウス胎生期における小 Maf 群因子の機能. 第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 21-24 日. 神戸
9. 弘津陽介, 勝岡史城, 山本雅之. Nrf2 誘導剤スクリーニング系の確立. 平成 21 年度合同班会議「遺伝子情報デコード」、2009 年 6 月 14-16 日 富山
10. 勝岡史城, 中山博未, 本橋ほづみ, Engel JD, 山本雅之. マウス胎生期における小 Maf 群因子の機能. 日本生化学会東北支部 第 75 回例会・シンポジウム、2009 年 5 月 9 日 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝岡 史城 (KATSUOKA FUMIKI)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 30447255

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし