

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650242

研究課題名(和文) 転写共役因子の多面機能を分割したエネルギー代謝動物モデルシリーズの開発

研究課題名(英文) Development of model mouse series by dividing multi functions of transcriptional co-repressor

研究代表者

城石 俊彦 (SHIROISHI, TOSHIHIKO)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：90171058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：Hairless (Hr)遺伝子のエネルギー代謝制御における役割を明らかにするため、複数の組織特異的Hr遺伝子突然変異シリーズの開発を試みた。まず骨格筋組織特異的にCre遺伝子を発現誘導するトランスジェニック(Tg)マウスを用いて、Hr遺伝子のコンディショナルなノックアウトマウス及び過剰発現Tgマウスの作製を行った。骨格筋特異的にHr遺伝子を欠損したマウスでは、残念ながら十分なHr遺伝子の発現低下が認められなかったが、Hr遺伝子過剰発現マウスでは遅筋型筋繊維が増加していた。従って、少なくともHr遺伝子が骨格筋特性に影響を与える可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：To understand the function of Hairless (Hr) in metabolism, we tried to develop a novel model mouse series in which Hr gene is conditionally targeted or over-expressed in a tissue-specific manner. Using Cre-loxP system, we developed conditional knockout mice of Hr gene, and CAG-loxP-CAT-pA-loxP-Hr transgenic mice that conditionally overexpress Hr gene. We also developed skeletal muscle specific Cre mice expressing Cre recombinase driven by Creatine kinase, muscle promoter. Using these genetically modified mice, we generated skeletal muscle specific Hr targeted

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：代謝 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

転写共役因子は、多岐にわたる転写因子との複合体形成によって、様々な遺伝子の発現を制御する。近年、転写共役因子の代謝疾患への関与が明らかとなり、病因・病態の理解と治療や創薬開発の観点から、転写共役因子の重要性が注目を浴びている(Reilly SM et al., Cell Metab.12: 643, 2010)。

国立遺伝学研究所で30年以上前に発見された自然発生マウス突然変異 *rim1* は、表現型解析により脱毛の他に複数の組織でエネルギー代謝異常を示すことが明らかになった。遺伝解析から、*rim1* の原因は既知の Hairless (*Hr*) 遺伝子の変異であることがわかった。*Hr* は、マウスやヒトの脱毛症の原因遺伝子であり、そのマウス変異体は専ら皮膚科学の分野で使用されており、*Hr* 遺伝子がエネルギー代謝に関与するという知見は得られていない。*Hr* 遺伝子は、転写共役因子をコードすることから (Potter et al., Genes & Dev.15: 2667, 2001)、共役する転写因子によってはエネルギー代謝制御に関わる可能性が浮上した。また、*Hr* 遺伝子は皮膚だけでなく脂肪や脳、筋肉組織でも発現している。*rim1* マウスが摂食過多という表現型を示すことから、摂食中枢における機能も予想される。したがって、皮膚を含めた多様な組織・臓器や脳中枢での多面的な表現型を遺伝学的に分割できれば、エネルギー代謝制御システムを体系的に分析できる独創的な疾患動物モデルシリーズになると考えた。

2. 研究の目的

エネルギー代謝疾患は、遺伝的・環境要因に加えて、複数の組織が生産するホルモン、サイトカイン、血中の脂質・糖、さらには神経作用などの組織・臓器間の複雑なクロストークの異常で発症する。従って、特定の組織あるいは細胞(脂肪・摂食中枢・筋肉・皮膚)に限定して *Hr* 遺伝子の機能を解析することで、各組織における *Hr* 遺伝子の機能を明ら

かにした上で、多面的な代謝異常を理解することを目的とした。

そのために、組織特異的な *Hr* 遺伝子改変マウス系統群(シリーズ)を作出し、エネルギー代謝に関わる多面的表現型を切り分けた革新的なエネルギー代謝動物モデルシリーズを開発する。各モデル間における表現型比較や網羅的な遺伝子発現解析から、転写共役因子である *Hr* 蛋白質が係わるエネルギー代謝制御システムの全貌を解明する。

3. 研究の方法

Hr 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウス (*Hr* cKOマウス) の作製および各組織(筋肉、皮膚、脂肪、脳)特異的に組換え酵素Creを発現するトランスジェニック(Tg)マウスの作製を行う。また、CAGプロモーターと loxP-CATpA-loxP配列を利用して、コンディショナルに *Hr* 遺伝子を過剰発現できるTgマウス (CAG-loxP-CATpA-loxP-*Hr* Tgマウス) を作製する。その後、*Hr* cKOマウスあるいは CAG-loxP-CATpA-loxP-*Hr* Tgマウスを、各組織で組換え酵素Creを発現するCreマウスと交配し、組織的に *Hr* 遺伝子が欠損した、あるいは過剰発現したミュータントマウスシリーズを作製し、表現型解析を行う。

4. 研究成果

(1) *Hr* cKOマウスの作製

Hr 遺伝子の exon 7-9 を挟む位置に loxP 配列を挿入した Targeting Vector を用い、相同組換えを起こした ES 細胞株から、*Hr* cKO マウスを作製した(図1)。

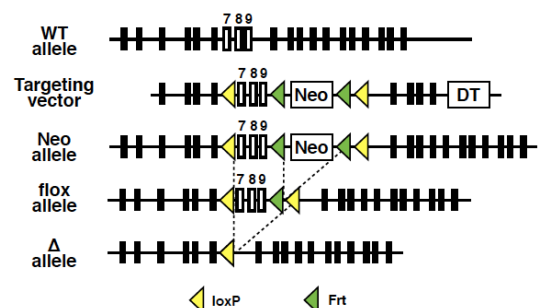


図1. *Hr* 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスの作製

全身に Cre を発現する CAG-Cre マウスとの交

配によって、*rim1* 変異体と同様の脱毛を示す表現型が再現されたことにより、コンディショナルに *Hr* 遺伝子を欠損させることができることを確認した (図 2)。

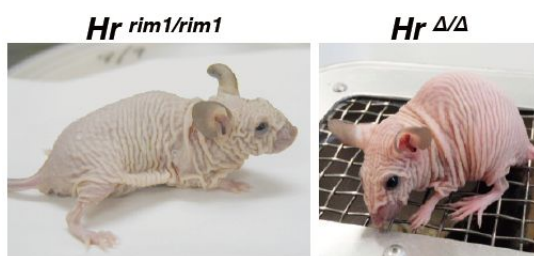


図 2. *rim1* マウスと *Hr* 遺伝子ノックアウトマウス

(2) CAG-loxP-CATpA-loxP-*Hr* Tg マウスの作製

コンディショナルに *Hr* 遺伝子を過剰発現させるため、CAG プロモーターと loxP-CATpA-loxP 配列の下流に *Hr* 遺伝子をつなげたトランスジーンを持つ CAG-loxP-CATpA-loxP-*Hr* Tg マウスを作製した (図 3)。CAT 遺伝子の発現定量によってトランスジーンが高発現する Tg ラインを選別した。

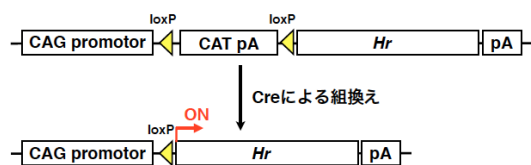


図 3. *Hr* 遺伝子過剰発現のためのコンストラクト

(3) 骨格筋組織特異的に *Cre* 遺伝子を発現誘導する Tg マウスの作製

Creatine kinase, muscle (*Ckm*) 遺伝子のプロモーター・エンハンサーの制御下で骨格筋組織特異的に組換え酵素 *Cre* 遺伝子を発現誘導する Tg マウス (*Ckm-Cre* マウス) を作製した (図 4)。

(4) 筋肉組織特異的に *Hr* 遺伝子が欠損あるいは過剰発現するミュータントマウスの解析

交配によって得られたダブル Tg マウス (CAG-loxP-pA-loxP-*Hr*, *Ckm-Cre*) の *Hr* 遺伝子発現を解析した結果、コントロールと比較して骨格筋組織のみで 20 倍発現量が上昇

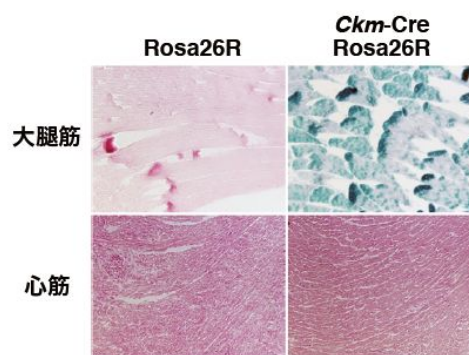


図 4. *Rosa26* レポーターマウス (*Rosa26R*) による *Ckm-Cre* マウスの組織特異性の確認

していた。ダブル Tg マウスの外見的所見では、腹這い状態の姿勢をしており、活動量の低下が観察された。このことから、四肢の筋力低下が考えられた。次に筋肉繊維の判別を行うため、各種 Myosin heavy chain 抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。結果、ダブル Tg マウスでは、遅筋型 (ミトコンドリア含量が低い) の筋肉繊維が増加していることが明らかとなった (図 5)。つまり *Hr* 遺伝子が筋肉繊維の分化あるいはエネルギー生成に関わることが考えられた。一方、*Ckm-Cre* マウスと交配し得られた *Hr* 遺伝子 cKO マウスでは、骨格筋組織において *Hr* 遺伝子発現の十分な低下が認められず、目立った表現型を明らかにすることは出来なかった。原因としては、*Cre* 遺伝子発現が十分でない、あるいは、*Cre* 遺伝子の発現細胞とは異なる細胞で *Hr* 遺伝子が発現している可能性が考えられた。

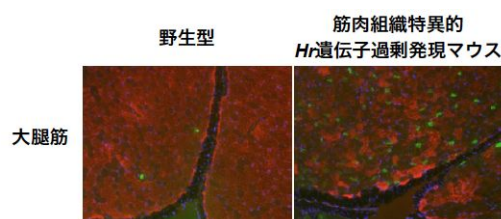


図 5. Myosin heavy chain (MHC) による筋繊維のタイプ判別
野生型と比較して *Hr* 遺伝子過剰発現マウスでは、速筋 (MHC type IIb: 赤) の割合が減り、遅筋 (MHC type I: 緑) の割合が増加している。

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)

〔学会発表〕(計 1件)

1. 田中成和、高田豊行、城石俊彦．エネルギー代謝制御における Hairless の新たな役割．日本遺伝学会第 84 回大会,九州大学医学部・百年講堂、9 月 24～26 日、2012 年

6．研究組織

(1)研究代表者

城石 俊彦 (SHIROISHI TOSHIHIKO)

国立遺伝学研究所・

系統生物研究センター・教授

研究者番号：90171058