

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430092

研究課題名(和文) 可変型遺伝子トラップマウスにおいて発現に性差を示す遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Sexually dimorphic gene expression in exchangeable gene trap mouse lines

研究代表者

吉信 公美子 (Yoshinobu, Kumiko)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・助教

研究者番号：20274730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、遺伝子トラップマウスの発現解析を進める中、特定の臓器で発現レベルに性差を示す遺伝子を見出した。C57BL/6(B6)系統のcDNAを使ったRT-PCRでは、Smyd2, Tcf12, Elov16の発現レベルにわずかな性差を認めた。

Elov16遺伝子トラップマウスの表現型を解析したところ、ヘテロ接合体同士の交配でホモ接合体は生まれるが、野生型やヘテロ接合体に比べ体重が軽く、その差は雄で顕著であった。しかし、B6系統でのリアルタイムPCRによる定量解析では、Elov16発現の顕著な性差は認められなかった。そのため、マウスElov16発現の性差は、タンパクレベルで生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We performed gene expression profiling in gene trap mouse lines and found sexual dimorphic genes. RT-PCR using cDNA of C57BL/6(B6) strain showed a slight difference between male and female in the expression of Smyd2, Tcf12 and Elov16.

In phenotype analysis of the Elov16 gene trap mouse, homozygous mice were born at the expected Mendelian ratio. However, body weight in homozygous mice was lower than wild-type mice and heterozygous mice, and the difference was remarkable in male. qRT-PCR using cDNA of B6 strain showed no difference between male and female in Elov16 expression. It was suggested that there was the sexual dimorphism of Elov16 expression in protein level.

研究分野：発生生物学、分子生物学

キーワード：性差発現 可変型遺伝子トラップ法 X-gal染色 表現型解析 Elov16遺伝子 EGTCデータベース

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト疾患における罹患率や薬の代謝に男女差がある場合があるため、性別を考慮した性差医療が重要視されている。基礎研究においては、哺乳類をはじめ多くの生物には雄と雌が存在するにも関わらず、これまで雄を標準とした解析が主流であった。性差研究においては、脳構築・行動・生殖腺の性分化に関しては盛んであるが、その他はあまり注目されていなかったが、マウスを使った解析から、性腺以外の雌雄共通の臓器にも性差発現を示す遺伝子が多く存在する事がわかり、性差発現の背景の解明が重視されるようになってきた。

我々は、個体レベルでの遺伝子機能解明を目指し、可変型遺伝子トラップ法により多くの遺伝子改変マウスを作製してきた(可変型遺伝子トラップクローンデータベース <http://egtc.jp>)。可変型遺伝子トラップマウスの成体において、X-gal 染色により全身の発現プロファイルを作製する目的で発現解析を進める中、発現パターンに性差を示す次の遺伝子を見いだした。転写因子 Tcf12(小腸: >)、ユビキチンリガーゼ Ube3c(膀胱: <)、長鎖脂肪酸慎重酵素 Elovl6(肝臓、白色脂肪: <)、ガラクトシル基転移酵素 4gal t5(腎臓: >)、レチノイン酸誘導因子 Rai14(白色脂肪 <)、ヒストンメチル化酵素 Smyd2(副腎、骨髄、食道、心臓、小腸、肝臓、筋肉、膵臓、脾臓、胃、胸腺: >)、ノンコーディング RNA 6720401G13Rik(胸腺: >)、ノンコーディング RNA CJ142626(脳: <、膵臓: >)(かっこ内は性差のあった臓器と染色の強さを示す。)これらの遺伝子は、性染色体上にはなく、インプリンティング領域にもなかった。

2. 研究の目的

本研究では、X-gal 染色において発現パターンに性差を認められた遺伝子について、内在性発現での性差を明らかにすること、また、遺伝子トラップマウスを利用して、雌雄間および遺伝子トラップマウスと野生型マウス間で、発現や表現型の比較解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)候補遺伝子について、C57BL6/N(B6)系統の雌雄各3匹から抽出したRNAから合成したcDNAを使って、RT-PCRにより内在性発現を検出し、雌雄間で発現レベルを比較した。

(2)Smyd2 および Elovl6 遺伝子トラップマウスを利用し、解析個体数を増やし X-gal 染色を行った。雌雄で発現解析および表現型解析を行い、比較した。

4. 研究成果

(1)RT-PCRの結果、顕著な差ではなかったが、

Smyd2 は脳と心臓(>)、Tcf12 は小腸(>)、Elovl6 は白色脂肪(<)で、X-gal 染色パターンと関連した結果であった。

(2)-1 Smyd2 遺伝子トラップマウスの解析

Smyd2 は心臓と脳で強い発現を示すが、Smyd2 ノックアウトマウスの心臓で表現型は見られなかった(雄のみ、Diehl F. et al, PLoS One. 2010)。そこで Smyd2 トラップマウスで心臓や脳の表現型を雌でも解析し、雄と比較することを計画した。まず、ヘテロ接合体で X-gal 染色の再検証を行った。しかしながら当初の解析(N2世代)で観察された性差は認められなかった。また、B6系統のRNAから合成したcDNAを用いたリアルタイムPCRによる定量解析においても、性差は観察されなかった。トラップラインは、TT2 ES細胞(B6×CBAのF1)由来であった。再検証に用いたのは、B6に戻し交配してN6世代以上の個体であった。このため、X-gal 染色結果が異なった可能性として、遺伝的背景の違いによるもので、B6とCBAのマウス系統種差による影響が考えられたが、今後の課題とした。

(2)-2 Elovl6 遺伝子トラップマウスの解析

表現型解析を行うための新たな遺伝子として、肝臓と脂肪において顕著な性差を示した Elovl6 に注目した。Elovl6 遺伝子トラップクローンを凍結胚から起こしライン化した。Elovl6 は、ラット肝臓においてRNAレベルおよびタンパクレベルでの性差が報告されている(Marks KA. et. al., Genes Nutr, 2013)。そこでマウスにおいて、表現型を雌雄間で比較することにした。まず、Elovl6 トラップマウス(N3-N6世代)のヘテロ接合体を用いて X-gal 染色をした結果、解析した10匹の肝臓と脂肪において雌で強い傾向を示した(図1)。

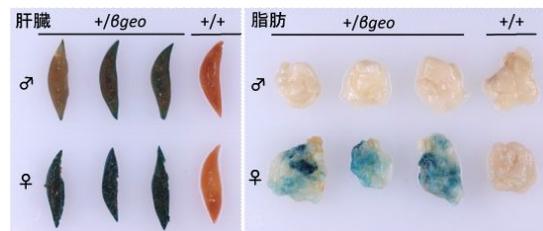


図1 ヘテロ接合体の X-gal 染色像

ヘテロ接合体同士の交配で、ホモ接合体はメンデルの法則に従って生まれたが、ホモ接合体は、野生型やヘテロ接合体マウスに比べると小さく、体重が軽かった。また、雌に比べて雄で有意に体重差が見られた。ホモ接合体では、Elovl6 発現は認められず、Elovl6 は完全に欠損していた。そのため、Elovl6 欠損の影響は、雄で顕著であることが示唆された(図2)。

新たに B6 系統の雌雄各6匹から抽出したRNAからcDNAを合成し、リアルタイムPCRに

よる定量解析を行った。しかし、雌雄間に顕著な差は見られなかった。そのため、マウスでは、Elavl6 発現の性差は、タンパクレベルで生じる可能性が示唆された。

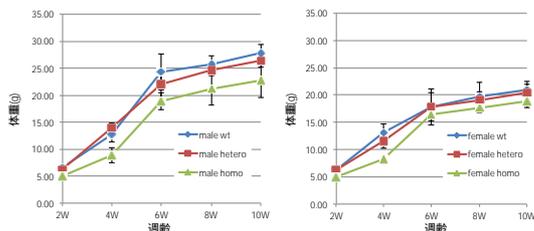


図 2 成長曲線

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 8 件)

(1)Kurogi S, Sekimoto T, Funamoto T, Ota T, Nakamura S, Nagai T, Nakahara M, Yoshinobu K, Araki K, Araki M, Chosa E. Development of an efficient screening system to identify novel bone metabolism-related genes using the exchangeable gene trap mutagenesis mouse models. *Sci Rep*. 2017 Jan 20;7:40692. doi: 10.1038/srep40692. 査読有

(2)Tanaka K, Kim SE, Yano H, Matsumoto G, Ohuchida R, Ishikura Y, Araki M, Araki K, Park S, Komatsu T, Hayashi H, Ikematsu K, Tanaka K, Hirano A, Martin P, Shimokawa I, Mori R. MiR-142 Is Required for Staphylococcus aureus Clearance at Skin Wound Sites via Small GTPase-Mediated Regulation of the Neutrophil Actin Cytoskeleton. *J Invest Dermatol*. 2017 Apr;137(4):931-940. doi: 10.1016/j.jid.2016.11.018. 査読有

(3)Kacso G, Ravasz D, Doczi J, Németh B, Madgar O, Saada A, Ilin P, Miller C, Ostergaard E, Iordanov I, Adams D, Vargedo Z, Araki M, Araki K, Nakahara M, Ito H, Gál A, Molnár MJ, Nagy Z, Patocs A, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Two transgenic mouse models for α -subunit components of succinate-CoA ligase yielding pleiotropic metabolic alterations. *Biochem J*. 2016 Oct 15;473(20):3463-3485. 査読有

(4)Goswami D, März S, Li YT, Artz A, Schäfer K, Seelige R, Pacheco-Blanco M, Jing D, Bixel MG, Araki M, Araki K, Yamamura KI, Vestweber D. Endothelial CD99 supports arrest of mouse neutrophils in venules and binds to neutrophil PILRs. *Blood*. 2017 Mar 30;129(13):1811-1822.

doi:10.1182/blood-2016-08-733394. 査読有

(5)Vanhoutteghem A, Delhomme B, Hervé F, Nondier I, Petit JM, Araki M, Araki K, Djian P. The importance of basonuclin 2 in adult mice and its relation to basonuclin 1. *Mech Dev*. 2016 May;140:53-73. doi: 10.1016/j.mod.2016.02.002. 査読有

(6)Nakakura S, Matsui M, Sato A, Ishii M, Endo K, Muragishi S, Murase M, Kito H, Niguma H, Kurokawa N, Fujii M, Araki M, Araki K, Ohya S. Pathophysiological significance of the two-pore domain K(+) channel K2P5.1 in splenic CD4(+)CD25(-) T cell subset from a chemically-induced murine inflammatory bowel disease model. *Front Physiol*. 2015 Oct 27;6:299. doi: 10.3389/fphys.2015.00299. 査読有

(7)Camarena V, Cao L, Abad C, Abrams A, Toledo Y, Araki K, Araki M, Walz K, Young JI. Disruption of Mbd5 in mice causes neuronal functional deficits and neurobehavioral abnormalities consistent with 2q23.1 microdeletion syndrome. *EMBO Mol Med*. 2014 Aug;6(8):1003-15. doi: 10.15252/emmm.201404044. 査読有

(8)Araki M, Nakahara M, Muta M, Itou M, Yanai C, Yamazoe F, Miyake M, Morita A, Araki M, Okamoto Y, Nakagata N, Yoshinobu K, Yamamura K, Araki K. Database for exchangeable gene trap clones: pathway and gene ontology analysis of exchangeable gene trap clone mouse lines. *Dev Growth Differ*. 2014 Feb;56(2):161-74. doi: 10.1111/dgd.12116. 査読有

[学会発表](計 27 件)

(1)吉信公美子、吉住友希、林田隆成、中原舞、荒木正健、荒木喜美、ゲノム編集による lincRNA トラップクローンの修正と解析、第 1 回日本ゲノム学会、2016 年 9 月 6-7 日、広島国際会議場(広島県・広島市)

(2)Nakahara M, Yoshinobu K, Furuhashi R, Kido Y, Sugimoto M, Yamamura K, Araki M, Araki K. Gene-trap mutagenesis is useful for analysis of long intergenic non-coding RNA genes in vivo, 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(3)永井琢哉、関本朝久、船元太郎、黒木修司、大田智美、中村志保子、中原舞、吉信公美子、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男、可変型遺伝子トラップ法で作製した Tmem161a 欠損マウスは明らかな骨量増加を呈する、第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、2016 年

10月13-14日、福岡国際センター（福岡県・福岡市）

(4) 荒木正健、武田伊世、大賀敏範、江藤聡、中原舞、吉信公美子、荒木喜美、染色体特異的にクラスターを形成しているトラップ領域(CSCT13)の解析、日本遺伝学会第88回大会、2016年9月7-10日、日本大学（静岡県・三島市）

(5) 國場訓、江藤聡、荒木美幸、森田彩香、來海葉子、山村研一、吉信公美子、荒木喜美、荒木正健、Cre-driver マウスラインの樹立と解析、日本遺伝学会第88回大会、2016年9月7-10日、日本大学（静岡県・三島市）

(6) 関本朝久、船元太郎、黒木修司、大田智美、中村志保子、永井琢哉、中原舞、吉信公美子、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男、可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨疾患に關与する新規遺伝子群のライブラリー構築、第89回日本整形外科学会学術総会、2016年5月12-15日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

(7) 吉信公美子、中原舞、山村研一、荒木喜美、荒木正健、lincRNA の生体内機能解析～遺伝子トラップマウスからのアプローチ～、第38回日本分子生物学会年会、2015年12月1-4日、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）

(8) Nakahara M, Yoshinobu K, Ito H, Furuhashi R, Yamamura K, Araki M, Araki K. Gene-trap mutagenesis is useful for analysis of long intergenic non-coding RNA genes, the 29th Annual Conference of the International Mammalian Genome Society, 2015年11月8-11日、横浜市開港記念会館（神奈川県・横浜市）

(9) 荒木正健、中原舞、柳井千佳、山添史雅、宮家幹子、森田彩香、岡本頼幸、荒木美幸、伊東春香、山村研一、吉信公美子、荒木喜美、遺伝子トラップマウスを用いた lincRNA の生体内機能解析、第62回日本実験動物学会総会、2015年5月28-30日、京都テルサ（京都府・京都市）

(10) 吉信公美子、來海葉子、慶田貴子、古閑成美、中原舞、山村研一、荒木喜美、荒木正健、可変型遺伝子トラップマウスの様々な組織におけるプロモーター活性解析、第55回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2014年9月27-28日、松本市中央公民館（長野県・松本市）

(11) 荒木正健、中原舞、中瀧直己、山村研一、吉信公美子、荒木喜美、可変型遺伝子トラッ

プマウスラインのパスウェイ解析及びジーンオントロジー解析、日本遺伝学会第86回大会、2014年9月17-19日、長浜バイオ大学（滋賀県・長浜市）

(12) 荒木正健、中原舞、柳井千佳、山添史雅、宮家幹子、森田彩香、荒木美幸、岡本頼幸、中瀧直己、吉信公美子、山村研一、荒木喜美、可変型遺伝子トラップクローンデータベース[EGTC]の開発と解析、第6回日本実験動物学会総会、2014年5月15-17日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

(13) 宮家幹子、森田彩香、柳井千佳、山添史雅、中原舞、荒木美幸、岡本頼幸、伊東春香、大西雄一郎、國場訓、山村研一、吉信公美子、荒木正健、荒木喜美、遺伝子トラップマウスを用いた lincRNA の生体内機能解析、第28回モロシヌス研究会、2014年6月27-28日、修善寺総合会館（静岡県・伊豆市）

(14) 吉信公美子、來海葉子、慶田貴子、古閑成美、中原舞、山村研一、荒木喜美、荒木正健、可変型遺伝子トラップクローンの進展、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6日、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）

(15) 荒木喜美、森田彩香、宮家幹子、吉信公美子、來海葉子、慶田貴子、古閑成美、中瀧直己、村上亜弓、門田雅世、目加田和之、吉木淳、荒木正健、可変型遺伝子トラップクローンを利用した Cre-driver マウスの作製、第60回日本動物学会総会、2013年5月15日、つくば国際会議場（茨城県・筑波市）

〔その他〕

ホームページ等

(1) 可変型遺伝子トラップクローンデータベース <http://egtc.jp>

(2) 熊本大学生命資源研究・支援センター 遺伝子実験施設ホームページ <http://gtc.egtc.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉信 公美子 (YOSHINOBU, Kumiko)

熊本大学生命資源研究・支援センター
・助教

研究者番号：20274730

(2) 研究分担者

荒木 正健 (ARAKI, Masatake)

熊本大学生命資源研究・支援センター
・准教授

研究者番号：80271609