

MSM/Ms マウスのユニークな表現型の遺伝学的解析

Genetic studies on unique phenotypes
in MSM/Ms mouse strain

山村 研一 (YAMAMURA KEN-ICHI)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授



研究の概要

日本産野生マウス由来のMSM/MsやJF1マウスは自発運動、がんや糖尿病に対する抵抗性など実験用マウスと比較しきわめてユニークな特徴を示す。ゲノム解析の結果から、その配列が0.86%異なっていることが明らかとなっている。ユニークな表現型のもとになる遺伝子を、発生工学技術を駆使して作製したキメラマウス・遺伝子改変マウスを用いて解明する。

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：野生マウス、膵炎、糖尿病、可変型相同組換え、ヒト化マウス

1. 研究開始当初の背景

日本産野生マウス由来のMSM/MsとC57BL/6(B6)マウスのゲノム配列は約0.86%ほど異なっている。このMSM/Msマウスは、B6マウス等と対比して、活発な自発運動、ウレタン誘発による肺がん抵抗性、高脂肪食時の肥満・糖尿病等に対する抵抗性など、きわめてユニークな表現型を示す。申請者らは、MSM/MsマウスからES細胞の樹立に成功し、きわめて効率よく生殖キメラを作製する方法を確立した。また、マウス遺伝子を完全破壊後に、望みの遺伝子で置換できる「可変型遺伝子ターゲティング法」も開発した。

2. 研究の目的

第1の目的は、「活発な自発運動の遺伝学的解析」である。MSM/MsとB6との間のキメラマウスの行動パターンと、脳内のMSM細胞の分布を比較することにより、関与する領域と遺伝子を同定することを目的とする。第2は、「疾患感受性/抵抗性の遺伝学的解析」であり、一つは「膵炎感受性の遺伝学的解析」である。膵炎に関与すると考えられる遺伝子の発現パターンを比較することにより、MSMに特徴的な遺伝子を同定する。二つ目は「糖尿病抵抗性」に関するもので、原因遺伝子が明らかになっている若年性成人型糖尿病(MODY)の原因遺伝子に焦点を当て解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 活発な自発運動

MSMとB6とでキメラマウスを作製する。

キメラマウスの行動解析を行うとともに、脳内のどの部分がMSM ES細胞由来であるかを解析する。そして、脳内のどの部分がMSMに由来すれば、MSMの行動パターンを取るかどうかを解析する。特定した脳の領域から候補遺伝子を同定する。

(2) 疾患感受性/抵抗性の遺伝学的解析

1) 膵炎感受性の遺伝学的解析

MSM/Ms、JF1、B6、C3Hを用いて、炎症に関連する遺伝子について、RT-PCR法、ウエスタンブロット法、ELISA法等で、発現を解析し、感受性/抵抗性と相関するかどうかを解析する。

2) 糖尿病抵抗性

MODY関連6遺伝子(である6種類遺伝子(HNF1 α , HNF1 β , Gck, HNF4 α , IPF-1, NeuroD)についてマウス遺伝子のヌル変異、ヒト正常遺伝子、ヒト変異遺伝子をもつマウスを作製し、糖尿病が発症するかどうかを解析する。

4. これまでの成果

1. 「活発な自発運動」の遺伝学的解析

MSM/Ms由来の細胞をlacZ遺伝子でマーキングした。キメラ作製に用いるB6レシピエントのX染色体にCAG-EGFPを挿入し、EGFP蛍光陰性の♂胚(XY)のみを選別、キメラ胚作製に用いた。この操作によりXY \leftrightarrow XYだけを実験に用いることができる。light/dark transition test (LD)、open-field test (OF)、home-cage activity test (HA)による行動解析の結果、MSMではLDにおいて

明箱進入潜時が長く、移動活動量が低く、移動速度も遅いこと、OF においては移動距離が短く、中心滞在率が低く、注意深い、いったん動き出すと俊敏性に優れていること、HA においては総活動量には大きな差がないが、暗期の活動性が高く、夜行性の特徴がより強いこと、総合的に情動性および不安が高いと推察された。次いで、作製したキメラマウスの行動解析を行った。その結果、4つのグループに分類できた。グループ1は、MSM とほぼ同じ行動、グループ2は、OF での移動活動性のみが B6 に類似、グループ3は、明期と暗期の切り替わり時のピークを示さないが、夜行性の特徴は強くなく B6/J 型、グループ4は B6 様の行動表現型で、暗期と明期の切り替わり時に高いピークを示し、夜行性の特徴は強くない。この行動パターンと、脳内での MSM 由来の細胞の分布を解析したところ、視床、中脳、橋、延髄がほとんど MSM 由来であれば MSM に類似することが分かった。

2. 「疾患の感受性・抵抗性に関する遺伝学的研究」

(1) 「膵炎の感受性/抵抗性の遺伝学的解析」

MSM は B6/J や JF1 と同じく、抵抗性であることを明らかにした。膵炎に關与すると考えられる遺伝子について、RT-PCR 法、ウエスタンブロット法、ELISA 法、プロテオーム法で解析した。その結果、JF1 においては Spink3, alpha1 anti-trypsin (Serpina1a) が、MSM では Prss2 が、C3H では Prss1, TNFa が、セルレイン投与後に有意に活性が高くなることを見いだした。JF1 や MSM の抵抗性は B6 とは異なったメカニズムによることが推察された。

(2) 「糖尿病の抵抗性の遺伝学的解析」

Hnf1a および Hnf1b については、ノックアウト(KO)マウス、正常ヒト遺伝子置換マウス、変異ヒト遺伝子置換マウスとも作製完了した。Pdx1 および Neuro1 については KO は完了、正常ヒト遺伝子置換マウスおよびヒト変異遺伝子置換マウスはキメラ作製を完了した。Gck1a および Hnf4a1a については、KO キメラ完了、正常ヒト遺伝子置換 ES およびヒト変異遺伝子置換 ES 完了した。Gck1b KO マウスは、野生型およびヘテロ欠損マウスに比して、随時血糖が 180-200mg/dl と高い傾向にあり、腹腔内グルコース負荷試験により、詳細な耐糖能について検討中である。Hnf1a ホモ欠損マウスは生後1週間頃に致死であった。ヘテロマウスについて腹腔内グルコース負荷試験を実施したところ、ヘテロは野生型に比して耐糖能が悪化している傾向にあった。

5. 今後の計画

- (1) 「活発な自発運動」の遺伝学的解析
MSM の行動パターンを取るキメラの中で、

共通して染色される領域を特定し、その領域をレーザーマイクロダイセクション法で採取し、mRNA の発現比較、プロテオーム解析を行い、MSM-B6 間で差の見られたタンパクを同定し、活発な自発活動性にかかわる遺伝子の特定を目指す。

2. 「疾患の感受性・抵抗性に関する遺伝学的研究」

(1) 「膵炎の感受性/抵抗性の遺伝学的解析」

Prss1, Spink3, Spirpala, Prss2, Tnfa のトランスジェニックマウスを作製し、膵炎と関連するかどうかを解析する。

(2) 「糖尿病の抵抗性の遺伝学的解析」

B6 については、6 種類の遺伝子のノックアウトマウス、正常ヒト遺伝子置換マウス、ヒト変異遺伝子置換マウスについて糖尿病が発症するかどうかの解析を行う。また、MSM ES を用いて KO マウスを作製し、解析を行う。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- ① Furuse T., Yamada I., Kushida T., Masuya H., Ikuo Miura., Kaneda H., Kobayashi K., Wada Y., Yuasa S., Wakana S. Behavioral and neuromorphological characterization of a novel Tubal1 mutant mouse. Behavioral Brain Research. 227: 167-174, 2012.
- ② Li, Z., Zhao, G., Shen, J., Araki, K., Haruna, K., Inoue, S., Wang, J. and Yamamura, K. Enhanced expression of human cDNA by phosphoglycerate kinase promoter-puromycin cassette in the mouse transthyretin locus. Transgenic Res. 20: 191-200, 2010
- ③ Wang, J., Ohmuraya, M., Suyama, K., Hirota, M., Ozaki, N., Baba, H., Nakagata, N., Araki, K. and Yamamura, K. Relationship of strain-dependent susceptibility to experimentally induced acute pancreatitis with regulation of Prss1 and Spink3 expression. Lab. Invest. 90: 654-64, 2010
- ④ Araki, K., Okada, Y., Araki, M. and Yamamura, K. Comparative analysis of right-element mutant lox sites on recombination efficiency in embryonic stem cells. BMC Biotechnol. 10: 29, 2010
- ⑤ Miike, K., Aoki, M., Yamashita, R., Takegawa, Y., Saya, H., Miike, T. and Yamamura, K. Proteome profiling reveals gender differences in the comparison of human serum. Proteomics 10:2678-2691, 2010.

ホームページ等

[http:// www.irda.kumamoto-u.ac.jp/](http://www.irda.kumamoto-u.ac.jp/)