

研究課題名 染色体導入マウスによる血圧制御領域の同定
所属研究機関名 筑波大学応用生物化学系 (TARA センター)
研究者氏名 谷本 啓司

研究計画の概要

■ 研究の趣旨・目的

生体の恒常性維持のためには遺伝子発現レベルでのフィードバック制御が不可欠である。私は以前、正常血圧の維持に不可欠な役割を果たすレニン-アンジオテンシン系 (Fig.1) のコンポーネントのノックアウト・マウスを作製した際、血圧の著しい低下とともに、同系における律速反応を触媒する酵素レニン遺伝子の発現上昇(約 10 倍)を観察した。これは、生体において血圧の低下に対する補償機構が存在し、レニン遺伝子の転写がその主要なターゲットとなっていることを示唆するものである。レニン遺伝子の発現制御機構については、その研究が遅々として進んでおらず、その最大の理由はレニン産生能を持つ培養細胞系の欠如と、そのモジュレーターが“血圧”という生理的な刺激であり、*in vitro* の実験系を構築することが困難であることにある。そこで私は、BAC(大腸菌人工染色体)トランスジェニック・マウスの系を用いて、このような“血圧応答性領域”を見いだすことを本提案研究の目的とした。

■ 研究計画の概要

上記の目的を達成するために、以下の研究計画を立案した。

まず、マウス・レニン遺伝子を含む BAC のクローニングを行う。このために BACPAC RESOURCES より High-Density Hybridization filter (RPCI-23 C57BL/6J Mouse BAC Library) を購入し、マウス・レニン cDNA プローブを用いて Southern Blot 法によりスクリーニングを行う。レニン遺伝子陽性であったクローンの番号に基づいて、BACPAC RESOURCES より大腸菌クローンを購入する。入手した大腸菌より BAC DNA を調製し、SfiI などの Rare cutter 酵素を用いて BAC DNA の制限酵素マッピングを行う。同時に、ゲノムプロジェクト・データベースを用いて BAC の全塩基配列情報を取得する。これにより、それぞれのクローンにおいて平均約 190kb のインサート中でレニン遺伝子がどの位置に存在するのかを明らかにする。

次に、大腸菌における Chromosome Engineering 技術を用いて、これまでに、主に培養細胞系において、レニン・プロモーター活性に何らか(正、あるいは負)の効果を持つことが報告されている発現制御“候補”領域に対して変異を加える。野性型、あるいは変異型 BAC DNA をパルス・フィールド・ゲルにより精製し、これをマウス受精卵の雄生前核に顕微注入することにより、トランスジェニック・マウスの作製を行う。End fragment analysis、Copy number analysis、Long range analysis 等を組み合わせることにより 1 コピーの導入遺伝子を無傷で保有するマウス系統を選別する。この後、Cre-loxP 反応を利用した co-placement 法により、染色体上の同位置に野性型、及び変異型の導入遺伝子を有するマウス垂系統を準備する。

このようにして確立したトランスジェニック・マウスについて RT-PCR 定量解析を行うことにより、導入した変異がレニン遺伝子の発現パターンに及ぼす効果を mRNA 転写のレベルで調べる。

以上の研究成果より、プロモーター活性に変化を与える変異が見つかった場合には、同導入遺伝子座を交配によりアンジオテンシノーゲン遺伝子欠損の遺伝的背景(すなわち、低血圧環境下)に持ち込み、変異型レニン遺伝子(発現制御領域)に対するフィードバック制御が保持されているかどうかを調べる。もし、フィードバック制御によるレニン遺伝子の過剰発現が見られなくなった場合には、変異を加えた遺伝子 DNA 領域が“低血圧”シグナルに応答する領域であることが強く示唆される。

研究計画の詳細報告

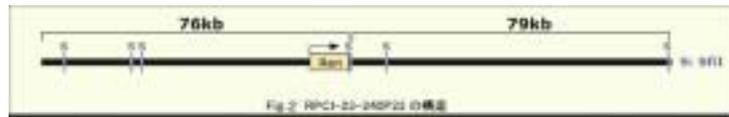
(単位：百万円)

研究項目	所要経費					合計
	13年度	14年度	15年度	16年度		
<記入例>						
1. 巨大 DNA の解析	12					12
[6]BACライブラリーのスクリーニングとレニン・クローンの取得	← 1 →					
(2)BACクローンの構造解析(マッピング)と変異導入	← 11 →					
2. トランスジェニック・マウスの作製		15				15
(1)BAC 導入トランスジェニック・マウスの作製と導入遺伝子の構造解析		← 15 →				
(2)アンジオテンシノーゲン・ノックアウト・マウスとの交配						
3. 遺伝子発現の解析						3
(1)レニン遺伝子の発現解析		← 3 →				
(2)血圧応答性領域とその結合タンパク質の生化学的解析						
(3)血圧応答に関わるシグナル伝達機構の解析						
所要経費(合計) (間接経費を含む)	12	18				30

研究成果の概要

研究計画の概要

レニン遺伝子導入マウスの作製に用いる DNA として、190kb の平均インサート長を有する大腸菌人工染色体 (BAC) ライブラリー (RPCI-23 Female



(C57BL/6J) Mouse Library) をスクリーニングし、14 個の陽性クローンを見いだした。これらのクローンを購入した後、マウス・ゲノムプロジェクトから既に塩基配列が分かっていた4つのクローンについて、制限酵素マッピングと Southern blot 解析を行った。レニン遺伝子がインサートのほぼ中央に位置し、塩基配列の信頼性が高いと考えられるクローン (240p23) を以降の解析に用いた (Fig.2)。

次に、レニン遺伝子発現の活性化に関与することが報告されている複数のシス DNA 領域に関して、クローン化した BAC DNA に変異を導入するため、ターゲットベクターの作製を行った。変異の種類としては、まず内在性マウス・レニン遺伝子と導入マウス・レニン遺伝子の転写産物を区別するために3'非翻訳領域に挿入型変異を導入した。これに加えて、レニン遺伝子5'転写制御“候補”領域である3カ所について、欠失、あるいは点突然変異を導入した (Fig.3)。

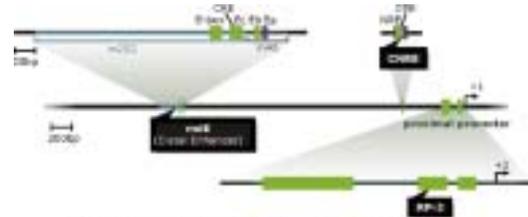


Fig.3 レニン遺伝子5'領域における発現制御候補領域

BAC DNA の線状化を行った後、パルスフィールド・ゲル電気泳動装置により BAC DNA の精製を行い、これを受精卵の雄生前核へ顕微注射することにより遺伝子導入マウスを作製した。F0 マウスのスクリーニングは尻尾から抽出した DNA の PCR により行い、Southern blot 法により確認を行った。F1 世代の遺伝子導入マウスを確立 (各変異について10系統前後) 後、パルスフィールド・ゲル電気泳動によりマウス染色体に導入された BAC DNA の構造を詳細に解析し、無傷の単一コピー遺伝子が導入されたマウス系統を各変異2-3系統に絞り、以降の実験に用いた。

遺伝子導入マウスを用いて発現解析研究を行う際の最も大きな問題点は、染色体上の異なる組みこみ位置による導入遺伝子の発現量の相違、すなわち「位置効果」である。この問題を完全に回避するため、本研究計画では Cre-loxP 組換えシステムを利用することにより、マウス染色体上の同位置に野生型

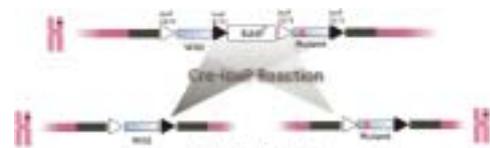


Fig. 4 Cre-loxP反応

及び変異型レニン遺伝子を組みこむ (co-placement) こととした。このため、Fig.4 に示すような導入遺伝子を設計した。導入遺伝子は loxP 配列の亜種である loxP2272 と loxP5171 とを交互に2つずつ有し、それぞれ異種の loxP 配列にはさまれる形で野生型及び変異型のレニン・プロモーター断片を配した。この導入遺伝子をもちいてトランスジェニック・マウスを作製した後、Cre 遺伝子を発現するトランスジェニック・マウスと交配させた。こうして得られる仔の生体内では、導入遺伝子中の loxP 配列と Cre タンパク質の間で Cre-loxP 反応が起こることが期待される。loxP5171 同士で組み換えが起こった場合は野生型プロモーター断片が残る、loxP2272 同士の場合には変異型プロモーター断片が残る (Fig.4, bottom)。このようにして、マウス染色体上の同位置に野生型、もしくは変異型レニン遺伝子を持つマウスを作製した。両者のマウスにおいては、導入遺伝子の発現量を直接比較することが可能である。

次に導入レニン遺伝子の転写量を解析するために、mRNA の定量的アッセイ系を構築した。本研究では、マウス・レニン遺伝子をマウス個体に導入しているため、例えば Northern blot 解析により導入遺伝子のみの発現を定量

することは非常に困難である。また、遺伝子導入法として Co-placement 法を用いていることもあり、より正確な定量手段が求められる。そこで、本研究項目では RT-PCR 法を用いて内在性と導入レニン遺伝子の発現量を同時に定量する系を確立した (Fig.5)。解析対象遺伝子として遺伝子導入レニン、内在性レニン、GAPDH 遺伝子を選び、それぞれに対する条件検討を行った。

生理的刺激負荷の予備実験、及び上記発現解析法の妥当性の検討のため、レニン遺伝子の発現を修飾することが知られている刺激 (高塩食、脱水等) を野性型マウスに与え、この時の内在性レニン遺伝子の発現動態の観察を行った (Fig.6)。その結果、高塩食により腎臓におけるレニン発現量が 1/2 に低下し、脱水により同発現量が 2 倍に増加した。これらは生体が血圧を一定に保とうとする際の合目的な反応であり、マウスに対する負荷のかけ方が適当であることと同時に、mRNA 定量法に信頼がおけることが確認された。

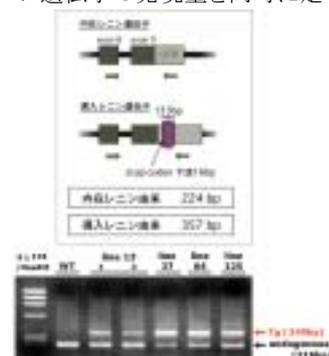


Fig.5 RT-PCRによるマウス腎臓導入レニン遺伝子の発現解析

「まとめと今後の予定」

1年半にわたる実験により、本提案研究に必要なほぼすべての遺伝子導入マウスとその解析系を手にしたことになる。今後は野性型、及び変異型遺伝子導入マウスを用いて、

- ① 定常状態における導入レニン遺伝子の各種組織における発現量
- ② 生理的刺激 (高塩食負荷、脱水、低血圧等) への応答能
- ③ 薬剤刺激 (レチノイン酸, cAMP, VD3 等) に対する応答能
- ④ レニン遺伝子欠損マウスのレスキュー実験による表現型の解析等の研究を行っていく予定である。

波及効果、発展方向、改善点等

高血圧症は、肥満、糖尿病、高脂血症と共に “The Deadly Quartet (死の四重奏)” として報告されており、これらは合併することが多く、心筋梗塞などの危険率を著しく高めることが知られている。この中でも高血圧症に関しては、その発症理由が明らかでないことが多く、これは本態性高血圧と呼ばれている。レニン・アンジオテンシン系の活性を下げれば (我々が明らかにした、遺伝子欠損マウスの解析結果から) 血圧が低下することは明らかで、実際に同系を構成する酵素の一つであるアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の阻害剤や、同系の最終活性産物であるアンジオテンシン II が、その受容体に作用するのを妨げるアンタゴニストは、効果が大変期待される治療薬として数多くの製品が開発され、また広く利用されている。しかしながら、これらは、高くなってしまった血圧を無理矢理、抑えつけているにすぎず、問題の本質的な解決にはなっていない。本研究により、血圧制御に関わる DNA 領域が見つければ、血圧の変化に応じて自律的に血圧制御系の活性を調節するツール (例えば、高血圧に反応して、レニン遺伝子のアンチセンスを発現する遺伝子治療ベクターなど) を開発することも夢ではなく、さらに将来的には、このような血圧応答性領域自体が遺伝子治療のターゲットと成り得るかもしれない。また、細胞表面の仮定上の “圧受容体” から、核内のレニン遺伝子へのシグナル伝達経路を解明できれば、そこをターゲットとした新たな治療薬の開発が始まる可能性もある。このように、本研究内容は、人々の “健康” を通して、社会や経済に多大に寄与しうる可能性を秘めている。



Fig.6 高塩食負荷及び脱水条件下におけるレニン遺伝子の発現

.研究成果公表等の状況

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合 計
国 内	0 件	0 件	0 件	0 件
国 際	0 件	0 件	0 件	0 件
合 計	0 件	0 件	0 件	0 件

(2) 特許等出願件数

合計 0 件 (うち国内 0 件、国外 0 件)

(3) 受賞等

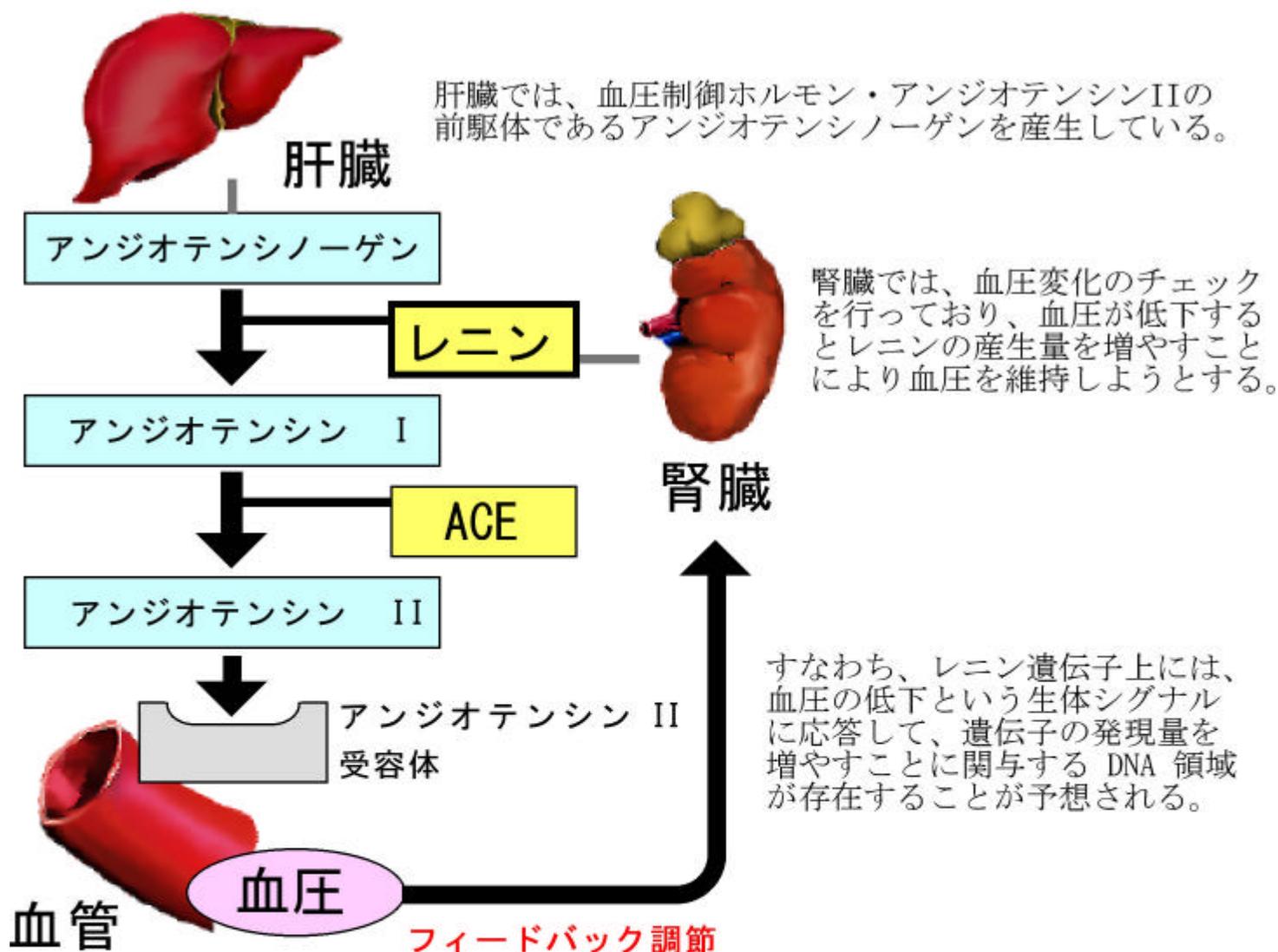
0 件 (うち国内 0 件、国外 0 件)

(4) 主な原著論文による発表の内訳

(5) 主要雑誌への研究成果発表

Journal	Impact Factor

レニン・アンジオテンシン系



生体環境を最もよく反映するトランスジェニック・マウスの系を用いて、このような低血圧応答性DNA領域を探索する。

トランスジェニック BAC (ミュータント・レニン・プロモーター)



アンジオテンシノーゲン遺伝子欠損マウスでは、血圧が低下し、補償的にレニン遺伝子の発現が10倍に上昇している。