

氏名・(本籍)	たなか 田 中	さとし 智
学位の種類	理 学 博 士	
学位記番号	理博第1229号	
学位授与年月日	平成3年3月28日	
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当	
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 生物学専攻	
学位論文題目	チロシナーゼ遺伝子を導入されたトランスジェニックマウス における形質転換	
論文審査委員	(主査)	
	教 授 竹 内 拓 司	教 授 長 内 健 治 助 教 授 井 出 宏 之

論 文 目 次

第1章 序論

第2章 材料と方法

- 1 マウス
- 2 培養液
- 3 マウスチロシナーゼミニ遺伝子
- 4 体外受精
- 5 受精卵へのDNA注入のための準備
- 6 DNAの注入
- 7 胚の移植
- 8 導入遺伝子の検定
- 9 光学顕微鏡試料の作製
- 10 トランスジェニックマウスのライン化

11 トランスジェニックマウスの命名法

第3章 結果

1 トランスジェニックマウスの作製

2 トランスジェニックマウスの形質

3 トランスジェニックマウスのライン化と形質の遺伝様式

第4章 考察

第5章 要約

謝 辞

引用文献

論文内容要旨

多細胞生物の個体発生は、それぞれの細胞で遺伝子が組織・時期特異的に発現し、さらにそれらの細胞間の相互作用によって新たな遺伝子発現のパターンを作り出すことによって遂行されると考えられる。このような遺伝子発現の調節機構を解析する手段として、目的とする遺伝子を単離してその発現調節に関与すると考えられる領域の塩基配列を改変し、それを染色体に挿入した個体を作製して個体発生における導入遺伝子の発現を調べる方法が可能になった。このような形質転換生物作製の試みは、シロイヌナズナやイネといった植物をはじめ、線虫、ショウジョウバエ、カエル、マウス等の動物でなされている。なかでもマウス受精卵への外来遺伝子の導入による形質転換マウス（トランスジェニックマウス）の作製の試みは、マウスにおいては遺伝学、発生学、生理学および分子生物学上の知見の蓄積が膨大であるという点や、ヒトの疾患モデルとしての有用性などという観点から盛んに行なわれている。それにより、例えば赤血球で特異的に発現する β -グロビン遺伝子のような、組織・時期特異的な発現をする幾つかの遺伝子の発現調節機構が明らかにされつつある。このような外来遺伝子の導入によるトランスジェニックマウス作製の際に、染色体上に外来遺伝子が挿入されて発現している個体を選出すためには、ゲノム DNA の解析や RNA の解析あるいは免疫学的手法を用いた検定などの煩雑で時間のかかる操作が必要である。しかし、もし外来遺伝子の導入とその発現が外見から容易に判断出来れば、遺伝子導入の検定や発現の検定に必要な操作を簡略化することが出来るので有利である。

本研究では、組織・時期特異的な発現をするチロシナーゼ遺伝子の発現調節機構を解析する目的で、マウスチロシナーゼミニ遺伝子である mg-Tyrs-J を BALB/c 系アルビノマウスの受精卵に顕微注入（マイクロインジェクション）法で導入してメラニンを産生するトランスジェニックマウスの作製を試みた。チロシナーゼ（EC 1.14.18.1）はメラニン合成の鍵酵素であり、その遺伝子はマウスでは第 7 染色体上の c 遺伝子座に位置する。また、その発現は神経管に由来する網膜色素上皮細胞と、神経冠細胞に由来する色素細胞に限定され、前者における発現が後者に先立って見られる。

近年、マウスチロシナーゼに対する cDNA が単離されそれを用いたチロシナーゼ遺伝子の発現調節機構の分子レベルでの解析が可能になった。本研究で用いたマウスチロシナーゼミニ遺伝子である mg-Tyrs-J はマウスチロシナーゼの cDNA クローンに、ゲノム DNA から単離された 2.5kb の長さのマウスチロシナーゼ遺伝子の 5'側上流領域を接続したものである。このミニ遺伝子を取り込ませたアルビノマウス由来の培養色素細胞内でメラニンの産生が見られたことから、mg-Tyrs-J の 5'側非転写領域にはチロシナーゼ遺伝子の発現調節に必要な配列が含まれていることが示唆されていた。そこで本研究では、mg-Tyrs-J の持つ 5'側上流領域が正常個体発生においても正常に作用して細胞種特異的なメラニン合成が見られるかどうかを確かめるために、mg-Tyrs-J を BALB/c 系アルビノマウスの受精卵に注入した。BALB/c 系アルビノ

マウスはc遺伝子座に異常を持つためにメラニンを全く産生していない突然変異体であるが、近年の分子レベルでの解析により、その異常はチロシナーゼ遺伝子の第1エクソン内の1塩基置換から来るチロシナーゼ酵素の不活性化によるものであることが推測され、チロシナーゼ遺伝子の転写および翻訳の過程には異常は無いものと考えられた。したがって、mg-Tyrs-JがBALB/c系アルビノマウスの染色体に挿入されて、チロシナーゼ遺伝子に作用する調節機構に従って正常に発現すれば、メラニンが産生されて眼と毛に色がついてアルビノ個体とは容易に区別することの出来るトランスジェニックマウスが得られることが期待された。

735個のBALB/c系アルビノマウス受精卵にmg-Tyrs-Jを注入しその受精卵を偽妊娠メスマウスの輸卵管に移植することにより53匹の個体を得られた。そのうち染色体にmg-Tyrs-Jが組み込まれた6個体がメラニンを産生しており、これらの個体をそれぞれTg.Tyrs-J2, Tg.Tyrs-J3, Tg.Tyrs-J4, Tg.Tyrs-J5, Tg.Tyrs-J6, Tg.Tyrs-J7と命名した。これらのファウンダー個体の形質には色の濃さと色のつく部域について差があったが、全てBALB/c系アルビノマウスの毛色に関する遺伝的背景を反映してアグチパターンを示した。Tg.Tyrs-J2の各臓器では、導入遺伝子が全細胞に分配されていたが、メラニンの蓄積は本来メラニンを産生する細胞のみに限定されていた。この結果から、mg-Tyrs-Jの5'側上流領域にマウスチロシナーゼ遺伝子の発現調節に必要な配列が含まれていることが明らかになり、この実験系を用いたチロシナーゼ遺伝子の発現調節機構の解析が可能であることが分かった。また、得られたファウンダー個体は眼におけるメラニンの蓄積により新生時にすでにアルビノ個体との区別が容易であった。このことはmg-Tyrs-Jが遺伝子導入実験において導入のマーカーストとしても有用であることを示している。

本研究で得られたファウンダー個体間の形質の差は、mg-Tyrs-Jの挿入された染色体上の位置における位置効果の結果であると思われる。導入遺伝子の発現に及ぼす位置効果の影響は、遺伝子導入実験の大きな問題点ではあるが、分子遺伝学への応用といった面から考えるとひとつの大きな利点でもある。つまり、従来知られている毛色に関する突然変異体の多くがチロシナーゼ遺伝子座以外の、他の遺伝子座に起こった突然変異の結果であるのに対して、ここで得られたトランスジェニックマウスの形質は導入したmg-Tyrs-Jの発現の変異によるものであるので、この変異の成因をmg-Tyrs-Jの挿入部分に絞って解析していくことが可能である。この位置効果の解析によっても、チロシナーゼ遺伝子の発現調節機構の一部が明らかになることが期待されるが、そのためにはゲノムDNAの一箇所に導入遺伝子が挿入されているような個体を作製する必要がある。そこで、それぞれのファウンダー個体とBALB/c系アルビノマウスとの交配によるトランスジェニックマウスのラインの樹立を行なった。その結果Tg.Tyrs-J3, Tg.Tyrs-J4, Tg.Tyrs-J5, Tg.Tyrs-J7からそれぞれ形質の異なる子孫が得られ、それらから、形質が安定して次世代に優性的に遺伝するラインが樹立された。J3ラインのトランスジェニックマウスでは主に頭部でスポット状にメラニンの産生が見られた。また、Tg.Tyrs-J5から樹立されたJ5C1サブラインのトランスジェニックマウスは、背側正中線を境界にして不規則に分

布する帯状のパッチを持っていた。これらのラインのトランスジェニックマウスにおいては、何らかの位置効果によって、1個体内で色素細胞に分化する運命の個々の神経冠細胞の間に導入遺伝子の発現レベルの差が生じており、その結果ある神経冠細胞に由来する色素細胞のクローン集団ごとに導入遺伝子の発現が異なっているものと考えられる。このような染色体の位置効果の分子的な機構が、本研究で得られたトランスジェニックマウスに関する今後の解析によって明らかにされれば、チロシナーゼ遺伝子の発現調節機構に関する知見あるいは導入遺伝子の受ける位置効果に関する一般的な知見が得られるものと思われる。

本研究の結果、mg-Tyrs-Jの5'側上流領域にチロシナーゼ遺伝子の細胞特異的な発現調節に必要な配列が含まれ、BALB/c系アルビノマウスの染色体に導入することで挿入箇所に関係なく細胞種特異的に発現してメラニンを合成することが明らかになった。したがってこの実験系を用いて、mg-Tyrs-Jの5'側領域の一部を欠失させたり塩基配列を改変したミニ遺伝子を用いてトランスジェニックマウスを作製し、その個体における発現様式の変化を調べることで、チロシナーゼ遺伝子の細胞種特異的な発現に関与する配列を同定することが可能である。今後は、チロシナーゼ遺伝子を用いたCATアッセイやフットプリント法で得られる知見から発現に関与すると考えられる領域を改変したmg-Tyrs-Jを用いてトランスジェニックマウスを作製して、チロシナーゼ遺伝子の細胞種特異的な発現の調節機構、網膜色素上皮細胞と皮膚の色素細胞間に見られる差次的発現の調節機構、あるいは他の色素細胞特異的な発現を考えると考えられている遺伝子との協調的な発現の調節機構等に関与するシスエレメントの同定を行なっていきたい。

論文審査の結果の要旨

多細胞生物においては多くの遺伝子が時期、細胞組織特異的に発現し、その結果として個体の発生分化が進行すると考えられている。哺乳類においてチロシナーゼ遺伝子は色素細胞の前駆細胞においてのみ胚発生の特定の時期に発現するものである。

著者はマウスのチロシナーゼ遺伝子の細胞種特異的発現に関与する調節機構を解析するために、チロシナーゼ cDNA にゲノムチロシナーゼ遺伝子の5'側上流約2.5kb を接続してミニ遺伝子を構築してアルビノマウス (BALB/c 系) の受精卵に導入した。

その結果約50個体の新生児が得られ、その中6個体にメラニン産生が観察された。このトランスジェニックマウスにおいては導入遺伝子がすべての組織に配分されているにもかかわらず、メラニン産生の認められるのは眼と毛色の色素細胞のみであった。すなわちチロシナーゼ遺伝子は細胞種特異的に発現していることが認められた。

一方、これら形質転換初代 (ファウンダー) の個体間には毛色の濃度とパタンにおいて差があり、導入遺伝子が組み込まれた場所のクロマチンの位置効果によるものと考えられ、その解析のために各ファウンダーに由来するトランスジェニックラインを樹立することを試みた。その結果興味あることに、ラインあるいはサブラインとして(1)全身に一樣にメラニン産生があり、野生型と区別つかないもの、(2)全身一樣にメラニン産生があるものの濃度のうすいもの、(3)頭部にスポット状にメラニン産生があるもの、(4)全身にパッチ状にメラニン産生があるもの、の4種類の形質が認められた。さらにこれらの形質がそれぞれのライン、サブラインにおいて優性形質として遺伝していることが確認された。

この実験結果から導入遺伝子が位置効果を受けることによってその発現の様式を変更すること、およびその変更によってある場合には局所的な組織環境要因の影響下におかれること、又ある場合には細胞系譜によって遺伝子の発現の固定化の程度が異なりそれがクローンとして伝達されることが示唆された。

この成果は多細胞生物の発生分化における遺伝子発現の調節機構に関する新しい知見であり、従ってこの論文は著者がこの分野において自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示しており、よって田中智提出の論文は理学博士の論文として合格と認める。