

氏名	かづき やすひろ 香 月 康 宏
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	甲第42号
学位授与年月日	平成16年 9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Human chromosome 21q22.2-qter carries a gene(s) responsible for downregulation of mlc2a and PEBP in Down syndrome model mice (ダウン症候群モデルマウスにおいて PEBP と mlc2a の発現低下を誘導する原因遺伝子領域はヒト 21 番染色 体 q22.2-qter に存在する)
学位論文審査委員	(主査) 佐藤 建三 (副査) 押村 光雄 林 眞一

## 学位論文の内容の要旨

近年、ダウン症候群のモデルマウス作成を目的としてヒト 21 番染色体を高頻度に保持するキメラマウスが作成され、先天性心奇形 (CHD) を含む様々なダウン症候群の症状を示すことが明らかにされた。また、その表現型の原因となる遺伝子発現の差を網羅的に解析するため、心筋におけるタンパク質発現の差を 2 次元電気泳動法により解析した結果、キメラマウスの心筋において心筋発生に重要なマウスタンパク質 Myosin light chain 2a (mlc-2a) の顕著な発現低下が認められ、ヒトダウン症患者由来心筋組織でも同様に mlc-2a の発現の減少が確認された。本研究の目的は、ダウン症モデルマウス心臓において、ダウン症心奇形の原因遺伝子の候補である mlc-2a タンパク質の低下を誘導しているヒト 21 番染色体上の原因遺伝子領域を染色体工学的手法により絞り込む事である。

### 方 法

まず、ヒト 21 番染色体を効率よく改変するためにヒト 21 番染色体を微小核細胞融合法(MMCT法)を用いてトリ DT40 細胞に導入した。次にヒト 21 番染色体上の ETS2 領域で染色体切断を行うため人工テロメア配列、優性選択マーカー(puromycin)および相同領域をもつベクターをヒト 21 番染色体移入 DT40 細胞に導入した。Puromycin(0.3 μg/ml)耐性クローンを取得し、ゲノム DNA を採取した。PCR 解析により ETS2 領域よりテロメア側に位置するマーカーの存在しない

クローンを選択し、サザンブロット解析および詳細な PCR 解析を行った。候補クローンをヒト特異的プローブおよび puromycin プローブを用いて FISH 解析し、切断の見られるクローンを次のステップに用いた。このクローンから MMCT 法を用いて CHO 細胞を介してマウス ES 細胞に導入しキメラマウスを作製した。毛色から 95% 以上のキメラ率の個体について以下の実験を行った。95% 以上のキメラ率の 4 個体を安楽死処理後、心臓を採取し RT-PCR による発現解析、FISH 法による染色体解析、2 次元電気泳動法による網羅的なタンパク質の発現解析を行った。

## 結 果

DT40 細胞中のヒト 21 番染色体の染色体改変効率は  $2/130$  であり、効率よく染色体を切断できた。ES 細胞への染色体移入効率は  $5 \times 10^{-6}$  であり効率は低いものの目的の改変ヒト 21 番染色体をマウス ES 細胞に導入することができた。得られた改変ヒト 21 番染色体導入 ES 細胞 20 クローンのうち PCR 解析、FISH 解析で目的の領域を保持し、正常核型である 3 クローンを用いてキメラマウスを作製したところ、様々な ES 細胞寄与率のマウス個体が作製できた。このうち高キメラ率の個体を用いて FISH 解析を行ったところマウス個体においてもヒト染色体はマウス ES 細胞中と同様にマウス染色体に転座することなく独立に 1 本維持されていることが確認できた。RT-PCR 解析の結果、ヒト 21 番染色体上の遺伝子はマウス心臓においてヒトと同様の発現パターンを示した。完全長ヒト 21 番染色体を保持するキメラマウス (Chr21 キメラ) で発現していた PFKL、UBE2G2、COL18A1、HRMT1L1 遺伝子は ETS2 領域からテロメア側を切断したヒト 21 番染色体を保持するキメラマウス (Chr 21E キメラ) では期待どおり発現していなかった。Chr21 キメラ、Chr 21E キメラおよび正常マウスの心臓を用いて、2 次元電気泳動法を用いた網羅的なタンパク質の発現解析を行ったところ、mlc-2a と phosphatidylethanolamine binding protein (PEBP) が完全長ヒト 21 番染色体移入キメラマウスで低下しているのに対し、切断ヒト 21 番染色体移入キメラマウスにおいて、これらのマウスタンパク質は低下していなかった。また、mlc-2a と PEBP は RNA レベルでの発現低下ではなく転写後の発現調節によりタンパク質発現低下が誘導されていることが半定量的 RT-PCR 法により確認された。

## 考 察

染色体切断の効率は  $2/130$  であったがベクターの相同領域に用いた配列と長さにより効率に変化すると考えられた。ヒト 21 番染色体の保持率は心臓で低い傾向が観察されたが保持率の高い個体は胎生致死になった可能性が示唆された。ダウン症の心奇形に関与することが示唆される mlc2a と PEBP タンパク質の発現低下に直接または間接的に影響を及ぼすヒト 21 番上の遺伝子は ETS2 からテロメア側に存在する PFKL、UBE2G2、COL18A1、HRMT1L1 遺伝子である可能性が示唆された。また、そのほかの候補遺伝子として心臓で発現しているヒト 21 番染色体上の遺伝子である ADARB1、PWP2H、SH3BGR が挙げられる。

## 結 論

ダウン症モデルマウスの心臓で発現低下のみられる *mlc2a*、PEBP のタンパク質発現の低下を誘導しているヒト 21 番染色体上の遺伝子は ETS2 領域からテロメア側に位置することが示唆された。このように染色体工学的遺伝子改変技術を用いることによりダウン症の症状に関与する候補遺伝子領域や劣性遺伝病の原因遺伝子をマッピングすることが可能になると考えられる。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は染色体工学的手法を用いてヒト 21 番染色体を部位特異的に切断しマウスに導入することでダウン症のモデルマウスを作製し、ダウン症心奇形に関与することが示唆される *mlc2a* と PEBP の発現低下を誘導するヒト 21 番染色体領域を同定したものである。DT40 細胞を用いてヒト 21 番染色体を効率的に改変し、微小核細胞融合法を用いてマウス ES 細胞に改変染色体を導入することでモデルマウスを作製した。このマウスを用いて RNA レベルの発現解析、二次元泳動法によるタンパク質の網羅的な発現解析を行った結果、*mlc2a* と PEBP の発現低下を誘導するヒト 21 番染色体領域は ETS2 からテロメア側であることが判明した。本論文の内容は、小児医療を含めた人類遺伝学の分野で、染色体改変技術の有用性を示唆するものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。