

厚生労働科学研究研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

腎疾患機能遺伝子の同定及びゲノム創薬に関する研究

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 宮田 敏男

平成 15 (2003) 年 3 月

## 目次

### 序文

主任研究者 宮田 敏男 東海大学総合医学研究所 助教授

### I 総括研究報告

腎疾患機能遺伝子の同定及びゲノム創薬に関する研究 1 - 7

主任研究者 宮田 敏男 東海大学総合医学研究所 助教授

### II 分担研究報告

1 Meg-4 遺伝子欠損マウスの作製 8 - 16

分担研究者 深水 昭吉 筑波大学先端学術領域センター 教授

2 抗ヒトメグシン抗体作製と診断・治療用抗体の探索 17 - 21

分担研究者 南学 正臣 東京大学医学部腎臓内科学 助手

## 序 文

日本のみならず世界先進国において、高齢化や生活習慣病（糖尿病）の増加に伴って透析患者数、透析医療費が急増している。特に、日本は人口あたりの透析患者数が世界第 1 位、総透析患者数も世界第 2 位であり、切実な問題である。実際、腎不全市場は 13 兆円/年と大きい。それに反し、腎疾患の診断・治療は未だ遅れており、副作用の強いステロイド以外で大規模臨床試験により薬効が証明されているのは一部の降圧薬のみである。このため、有効な腎治療は食事制限などの保存的な治療法が主流である。診断も、侵襲的な腎生検による病理学的診断によってのみ可能であり、採血・検尿など非侵襲的検査法で病型分類の診断や薬剤効果を行うのは不可能である。

このような現状から、腎疾患特異的な機能遺伝子を同定し、それを標的分子として治療、診断の開発を行うことが急務とされている。そこで我々は、腎糸球体に特徴的な細胞で、その機能・構造、ひいては腎炎発症進を司るメサンギウム細胞に着目し、メサンギウム細胞のゲノミクス、トランスクリプトーム、プロテオミクスに着手してきた。その結果、これまでにメグシン、PP4Rmeg, meg-2, meg-3, meg-4 などの腎特異的高発現新規遺伝子群を単離同定し、これら遺伝子の中から腎疾患診断・治療に有用な標的分子の同定を試みてきた。

本研究では、1)メサンギウム特異的発現分子抗体を用いた腎疾患診断法の開発、2)メグシン蛋白の活性を抑制する中和抗体の開発、3)メサンギウム細

胞特異的遺伝子発現システムの解析、4) 腎特異的高発現新規遺伝子群の機能解析、5) これら腎特異的高発現新規遺伝子と相互作用する蛋白質群の解析（プロテオミクス）に関する研究を重点的に進めた。その結果、なかでもメグシンは、腎疾患発症進展に深く関与する糸球体特異的機能遺伝子ことが明らかにされ、診断・治療標的分子としての意義が示唆する一連の知見と研究材料が得られた。このことは、これまで糸口のなかった診断・治療の上で確実に新たな糸口を与えるものである。また、他の腎特異的高発現新規遺伝子群に関しても、リコンビナント蛋白、特異的抗体、遺伝子高発現・欠損マウスなどの作製が完了し、今後のゲノム創薬を目指したポストゲノム研究、ひいてはトランスレーショナル研究に有用なツールが整えられた。

本研究では、腎特異的高発現新規遺伝子群のポストゲノム研究を通じて、これまで困難とされてきた腎炎診断・治療標的分子同定に重要な手がかりを与え、腎疾患に対するゲノム創薬の可能性を大いに期待させる。

平成 15 年 3 月

主任研究者 宮田 敏男

(東海大学総合医学研究所 助教授)

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
総括研究報告書

腎疾患機能遺伝子の同定及びゲノム創薬に関する研究

主任研究者 宮田 敏男 東海大学総合医学研究所 助教授  
分担研究者 深水 昭吉 筑波大学先端学際領域センター 教授  
分担研究者 南学 正臣 東京大学医学部腎臓内科学 助手

A 研究目的

我が国では末期腎不全透析患者数は現在 20 万人を超え、透析医療費は年間 13 兆円に至る。しかし、未だに腎疾患の診断は侵襲的な腎生検が中心であり、治療薬もステロイドや一部の腎保護作用が確認された降圧剤以外には皆無である。

我々は、腎炎発症進展において重要なメサンギウム細胞のゲノミクス、トランスクリプトーム解析から、メグシン、PP4Rmeg, meg-2, meg-3, meg-4 などいくつかの新規メサンギウム細胞高発現機能遺伝子群を単離同定した。

本研究では、これら遺伝子のポストゲノム研究を展開し、腎疾患診断・治療に有用な標的分子を提供することである。このため、1)メサンギウム特異的発現分子抗体を用いた腎疾患診断法の開発、2)メグシン蛋白の活性を抑制する中和抗体の開発、3)メサンギウム細胞特異的遺伝子発現システムの解析、4)腎特異的高発現新規遺伝子群の機能解析、5)これら腎特異的高発現新規遺伝子と相互作用する蛋白質群の解析（プロテオミクス）

を行った。

B 研究方法

1) メサンギウム特異的発現分子抗体を用いた腎疾患診断法の開発

メグシン, PP4Rmeg, meg-2, meg-3, meg-4 に対するリコンビナント蛋白や合成ペプチドを作製し、ポリクローナル抗体、単クローナル抗体の作製を試みた。これら抗体で、正常人及び腎疾患患者（糖尿病、慢性腎炎）腎組織を免疫組織学的に解析し、障害時の蛋白発現及びその局在を検討した。また、サンドイッチ ELISA 法を組み、患者尿・血液に応用して、腎疾患診断システムとしての可能性を検討した。

2) メグシン蛋白活性を抑制する中和抗体の開発

メグシンリガントとなるセリンプロテアーゼの単離・同定を試み、その一つがプラスミンであることを同定した。メグシンとプラスミンの結合を指標に、活性を阻害する中和抗体を探索した。

### 3) メサングウム特異的遺伝子発現システムの解析

メグシンのメサングウム特異的発現機構を明らかにするためメグシン転写開始点上流シス領域のエンハンサー/プロモーター活性、および結合転写因子の単離・同定を試みた。また、各種のメグシン転写領域（メグシン転写上流域約 4kbp、第 I イントロン付近 6-10kbp、メグシンゲノム全長とその近傍を含む 150kbp 遺伝子断片）を導入したトランスジェニックマウスを作製し、*in vivo* における転写活性を検討した。

### 4) 腎臓特異的高発現新規遺伝子群の機能解析

PP4Rmeg, meg-2, meg-3, meg-4 に対するトランスジェニックマウスを作製・解析した。また、メグシン, meg-3, meg-4 の遺伝子欠損マウスを作製した。これらマウスと他の腎炎関連遺伝子改変マウスとの交配による多重遺伝子改変マウスなどを作製・解析した。

### 5) これら腎特異的高発現新規遺伝子と相互作用する蛋白質群の解析

酵母 2 ハイブリット(Y2H)スクリーニング法にて、腎特異的高発現新規遺伝子と相互作用する蛋白質群を解析した。4 種類の蛋白質(PP4Rmeg, meg 3, meg 4, メグシン)について、ベイトをそれぞれ 15 種類、10 種類、12 種類、11 種類の計 48 種類設計した。転写活性化ドメイン融合型 cDNA ライブラリーとしては、ヒト腎臓ライブラリー、ヒト肝臓・小腸・脂肪組

織ライブラリーを混合したライブラリー、そしてヒトメサングウム細胞ライブラリーの 3 種類を使用した。

(倫理面への配慮)

ヒト組織を用いた実験は、全て東海大学医学部「医の倫理委員会」によって承諾され、その規則に従って施行した。いずれの検体も提供者にご依頼・説明書を提示し、同意書によるインフォームドコンセントを得、そのプライバシーが十分に保たれた条件にて用いた。すべての動物実験は動物福祉の立場からの要請や法的規制に十分従い、個体に最も負担の少ない実験手技を用いた。

### C 研究結果及び考察

#### 1) メサングウム特異的発現分子抗体を用いた腎疾患診断法の開発

メグシン, PP4Rmeg, meg-3, meg-4 全てに対して特異的抗体が得られた(図 1)。特に、メグシンは尿中에서도安定で存在することが証明され、腎障害を呈するメグシン高発現マウス/ラットの尿中からメグシンを検出した。これまで得られたメグシン抗体により数 ng/ml オーダーのメグシン検出を可能にする ELISA 系が確立され、正常人・患者濃縮尿からメグシン蛋白が検出できた。メグシン, meg-3 の抗体の中には、ヒトメサングウムを検出可能なものがあり、免疫組織染色用の抗体もいくつか取得出来た。メグシン抗体で、メサングウム領域のみならず糸球体上皮細胞にも陽性シグナルが強く検出され、メグシン蛋白が糸球体上皮細胞で機能す

る可能性も示唆された。

#### 2) メグシン蛋白活性を抑制する中和抗体の開発

約 100 クローンの抗ヒトメグシン単クローン抗体から探索することにより、幾つかの中和抗体が取得出来た。この中和抗体の認識部位もペプチドマッピングにより決定でき、メグシン活性中心部位内にあるプロテアーゼ切断部位近傍 6 アミノ残基を認識していた。

#### 3) メサンギウム特異的遺伝子発現システムの開発

メサンギウム細胞特異的遺伝子発現システムの開発に関しては、これまでに、メグシン転写上流域約 4kbp 内に存在する cis-acting element (-240 bp から -70bp) の存在を明らかにし、その活性の一部は AP-1 によって制御されていた。しかし、この領域内ではメサンギウム細胞特異的転写活性が弱く、解析範囲を広げ、第 I イントロン付近 6-10kbp、メグシンゲノム全長とその近傍を含む 150kbp 遺伝子断片を導入したマウスを作製し検討を行っているが、これまでのところ新たな正の転写活性領域は同定出来ていない。

#### 4) 腎臓特異的高発現新規遺伝子群の機能解析

PP4Rmeg は、セリン/スレオニンプロテインフォスファターゼ 4 の調節サブユニットであり、これと複合体を形成する PP4C は、細胞質、核と中心対に局

在し、微小管構築に関与する。実際、酵母 2 ハイブリット(Y2H)スクリーニングにて、細胞骨格系蛋白質との相互作用が確認された。meg3 の生理機能については不明であるが、N 末端付近の PH ドメインと C 末端付近のプロリンリッチドメインが存在し、シグナル蛋白質であると推測される。Meg4 は、ミトコンドリア内膜に局在する AAA 依存型メタロプロテアーゼであることが明らかとなった。

遺伝子背景の異なるメグシン高発現マウス、他の腎炎関連遺伝子改変マウスとの交配による多重遺伝子改変マウスなどの作製を一部完了し、1) メグシンはマウスの遺伝子背景にほとんど依存しない、2) 自己免疫疾患モデル動物 (MRL/lpr) との交配や、片腎摘出による人為的腎負荷によって腎炎の発症が加速した。meg-2, meg-3, あるいは meg-4 遺伝子高発現マウスの腎炎自然発症を経時的に検討したが、メグシン高発現マウスのような腎炎発症は認められなかった。また、これらマウスは腎負荷により腎病変の増悪は認められず、糸球体障害に対する修復能にも変化はなかった。メグシン、Meg-4 のヘテロ欠損マウスの作製に成功した。

#### 5) これら腎特異的高発現新規遺伝子と相互作用する蛋白質群の解析

酵母 2 ハイブリット(Y2H)スクリーニングの結果、PP4Rmeg と相互作用するプレイ蛋白質 59 種類、MEG3 からは 11 種類、MEG4 からは 13 種類、MEGSIN

からは9種類の計92種類を同定した(一部重複あり)。陽性確認テスト、偽陽性排除テストを実行した結果、13種類プレイ蛋白質が偽陽性と判断された。それらの情報に基づいて蛋白相互作用を解析し、メグシンと相互作用する蛋白群(図2)とメサングウム細胞におけるメグシン、PP4Rmeg, meg-3, meg-4のネットワークが推測された(図3)。

#### D 評価

##### 1) 達成度について

本研究で、メグシン、PP4Rmeg, meg-2, meg-3, meg-4など腎臓特異的高発現新規遺伝子群に対するポストゲノム研究を施行した。また、これら分子のリコンビナント蛋白、特異的抗体、遺伝子高発現・欠損マウス、新規遺伝子群の蛋白相互作用解析(プロテオミクス)を予定通り終了した(図1)。

メグシンについては、腎疾患診断・治療に有用な標的分子であることを示唆する一連の知見と研究材料を十分に得ることが出来た。一方、PP4Rmeg, meg-2, meg-3, meg-4は研究材料の充溢に時間が予想以上に掛かり、病態生理学的意義の解析は十分に施行できず、腎疾患診断・治療に有用な標的分子であることを示すに至っていない。

メグシンに対する100以上のモノクローナル抗体を取得し、この中には免疫組織学的にメサングウムを中心とした領域に強く反応する抗体、尿中からメグシンを検出する抗体、さらにはメグシンの活性を阻害する中和抗体が含

まれており、診断・治療上有用性が期待出来る抗体が取得された。ただ、実用化には、まだ不十分であり、最適化が不可欠と考えられる。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

日本のみならず先進国において、高齢化や生活習慣病(糖尿病)の増加に伴って透析患者数、透析医療費が急増した。特に、日本は人口あたりの透析患者数が世界第1位、総透析患者数も世界第2位であり、切実な問題である。実際、腎不全市場は13兆円/年と大きい。一方、腎疾患の診断・治療は未だ遅れている。副作用の強いステロイド以外で大規模臨床試験により薬効が証明されているのは一部の降圧薬のみである。このため、腎治療は未だ食事制限などの保存的な治療法が主流である。診断も、侵襲的な腎生検による病理学的診断によってのみ可能であり、採血・検尿など非侵襲的検査法で病型分類の診断や薬剤効果を行うのは不可能である。腎生検の以外方法で簡便に評価できれば診断学的及び治療学的にも大変に意義が大きい。

腎疾患の診断・治療が遅れている理由は市場が小さいためではなく、腎疾患の病態の中心であるメサングウム細胞の特異的機能遺伝子などの情報が得られていないことが主因である。メグシンの発見は、これまで糸口のなかった診断・治療の上で確実に新たな糸口を与えた。アメリカのベンチャー企業、



大手製薬メーカーがメサンギウム細胞機能遺伝子の同定をめざして研究を開始したが、メサンギウム細胞機能遺伝子に関する具体的な報告はなく、現在のところメグシン以外にない。

本研究で、メグシン、PP4Rmeg, meg-2, meg-3, meg-4 など腎臓特異的高発現新規遺伝子群に対する一連の知見を得た。また、本研究で得られたリコンビナント蛋白、特異的抗体、遺伝子高発現・欠損マウスは有用なツールとなる。

### 3) 今後の展望について

すでに、メグシンに対する 100 以上のモノクローナル抗体を取得しており、この中には免疫組織学的にメサンギウムを中心とした領域に強く反応する抗体、尿中からメグシンを検出する抗体、さらにはメグシンの活性を阻害する中和抗体が含まれている。今後、さらに多くのモノクローナル抗体を取得し、免疫組織化学研究試薬、尿中診断 ELISA、治療用抗体に適合するよう最適化し、実用化に向けた研究を展開する必要がある。また、PP4Rmeg, meg-2, meg-3, meg-4 に対する特異的抗体、遺伝子高発現・欠損マウス、蛋白相互作用解析に基づき、これら分子の病態生理学的意義、診断・治療標的分子としての有用性の有無に関して研究を完了する。

### E 結論

新規メサンギウム細胞高発現機能遺伝子群メグシン、PP4Rmeg, meg-2, meg-3, meg-4 のポストゲノム研究を展

開し、これら分子に対する特異的抗体作製、遺伝子改変（高発現、欠損）マウス・ラットの作製・解析、新規遺伝子群の蛋白相互作用解析を施行した。また、メサンギウム細胞に特異的に遺伝子が発現する機序を明らかにするため、転写開始点上流域を解析した。メグシンが腎疾患診断・治療に有用な標的分子であることを示唆する一連の知見が得られた。メグシンに対する 100 以上のモノクローナル抗体が取得でき、この中には免疫組織学的にメサンギウムを中心とした領域に強く反応する抗体、尿中からメグシンを検出する抗体、さらにはメグシンの活性を阻害する中和抗体が含まれていた。まだ、実用化レベルにないが、今後、抗体の多様化・最適化により、診断・治療上有用性が期待出来る抗体が取得される。

### F 研究発表

#### 論文発表

#### —国外—

- 1 Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Imasawa T, Sato M, Izuhara Y, Suzuki D, Yoshino A, Onogi H, Kimura M, Sugiyama S, Kurokawa K Overexpression of the serpin megsin induces progressive mesangial cell proliferation and expansion **J Clin Invest** 2002, 109 585-593
- 2 Inagi R, Miyata T, Imasawa T, Nangaku M, Kurokawa K Mesangial cell-predominant gene, megsin **Nephrol Dial Transplant** 2002, 17 (Supple9) 32-33

- 3 Inagi R, Miyata T, Nangaku M, Ueyama H, Takeyama K, Kato S, Kurokawa K  
Transcriptional regulation of a mesangium-predominant gene, megsin **J Am Soc Nephrol** 2002, 13 2715-2722
- 4 Kurokawa K, Nangaku M, Inagi R, Miyata T Perspectives of chronic renal failure **Nephrology** 2002, 7 S145-S150
- 5 Sogabe H, Richard J Q, Okada N, Miyata T, Inagi R, Kurokawa K, Fujita T, Nangaku M Gene therapy for renal injury model rat using an adenovirus vector encoding the soluble rat crry gene **Clin Exp Nephrol** 2002, 6 216-223
- 6 Kurokawa K, Nangaku M, Saito A, Inagi R, Miyata T Current issues and future perspectives of chronic renal failure **J Am Soc Nephrol** "in press"
- 7 Kurokawa K, Nangaku M, Saito A, Inagi R, Miyata T Future perspectives of chronic renal failure **Am J Kidney Dis** "in press"
- 8 Onogi H, Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Kurokawa K Serpin, megsin and plasmin **Contributions to Nephrology** "in press"

—国内—

- 1 宮田敏男 糸球体機能とメグシン 医歯薬出版株式会社 医学のあゆみ. 2002, 200-13・968
- 2 稲城玲子, 宮田敏男 新規セルピン”メグシン”の糸球体における病態生

理機能 医歯薬出版株式会社 医学のあゆみ. 2002,別冊 53-56

学会発表

—国外—

- 1 Inagi R, Miyata T, Nangaku M, Izuhara Y, Onogi H, Kurokawa K Mesangium-predominant serpin, megsin, inhibits the serine protease activity of plasmin **The 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology.** in Philadelphia (U S A ) November 1-4, 2002

—国内—

- 1 宮田敏男 糸球体障害に向けてのゲノム創薬 第12回長崎腎臓フォーラム. 2002 4 9 長崎
- 2 宮田敏男 腎疾患ゲノム創薬 腎保護・再生研究会. 2002 4 12 京都
- 3 宮田敏男 糸球体障害に対するゲノム創薬 第31回東海腎不全研究会. 2002 5 18 名古屋
- 4 上山 博、宮田敏男、稲城 玲子、小野木 博、伊豆原 優子、南学 正臣、黒川 清 メサンギウム細胞高発現遺伝子 megsin の転写調節機構 第45回日本腎臓学会学術総会. 2002 5 24 大阪
- 5 伊豆原 優子、宮田敏男、稲城 玲子、小野木 博、國頭 一也、朝倉 昌博、上田 裕彦、南学 正臣、黒川 清 抗人 megsin 中和抗体の作製 第45回日本腎臓学会学術総会. 2002 5 24 大阪

- 6 稲城 玲子、宮田敏男、伊豆原 優子、小野木 博、南学 正臣、黒川 清  
メグシン標的セリンプロテアーゼ（メグシンリガンド）の同定 第45回  
日本腎臓学会学術総会. 2002.5.24  
大阪
- 7 宮田敏男 糸球体障害に向けてのゲノム創薬 第8回静岡循環器・成人病フォーラム. 2002.7.12 静岡
- 8 宮田敏男 腎疾患に対するゲノム創薬 産業医科大学大学院講義. 2003.1.31 福岡

# 図1 新規メサンギウム細胞高発現遺伝子群のポストゲノム解析一覧

クローン	メグシン	PP4Rmeg	Meg-2	Meg-3	Meg-4
細胞内局在	細胞質/分泌	細胞質/核内	細胞質?	細胞質	ミトコンドリア
機能	セリン プロテアーゼ インヒビター	セリン/スレオニン フォスファターゼ4 制御ユニット	?	シグナル 伝達蛋白?	ATP依存型 メタロプロテアーゼ
リコンビナント 蛋白精製	○	—	—	○	○
蛋白相互作用解析 (two hybrid法)	○	○	—	○	○
ポリクローナル抗体 (ペプチド抗体等)	○	○	○	○	○
モノクローナル抗体	○	—	—	—	—
診断用抗体	○	—	—	—	—
活性阻害中和抗体	○	—	—	—	—
遺伝子導入マウス	○	—	○	○	○
遺伝子欠損マウス	○	—	—	○	○

○:完了

**図2 メグシンと相互作用する蛋白群の解析  
(酵母2ハイブリットスクリーニングによる)**

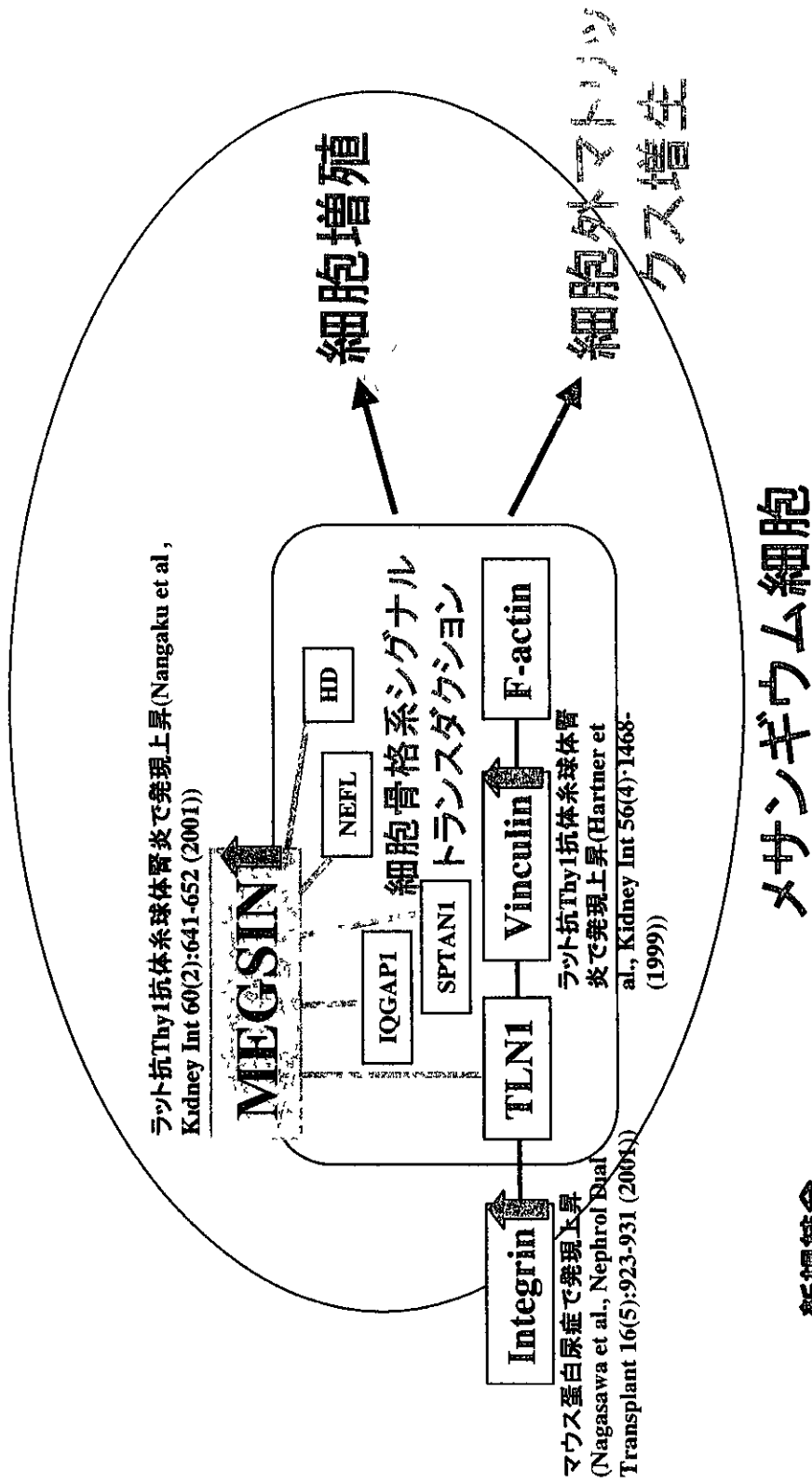
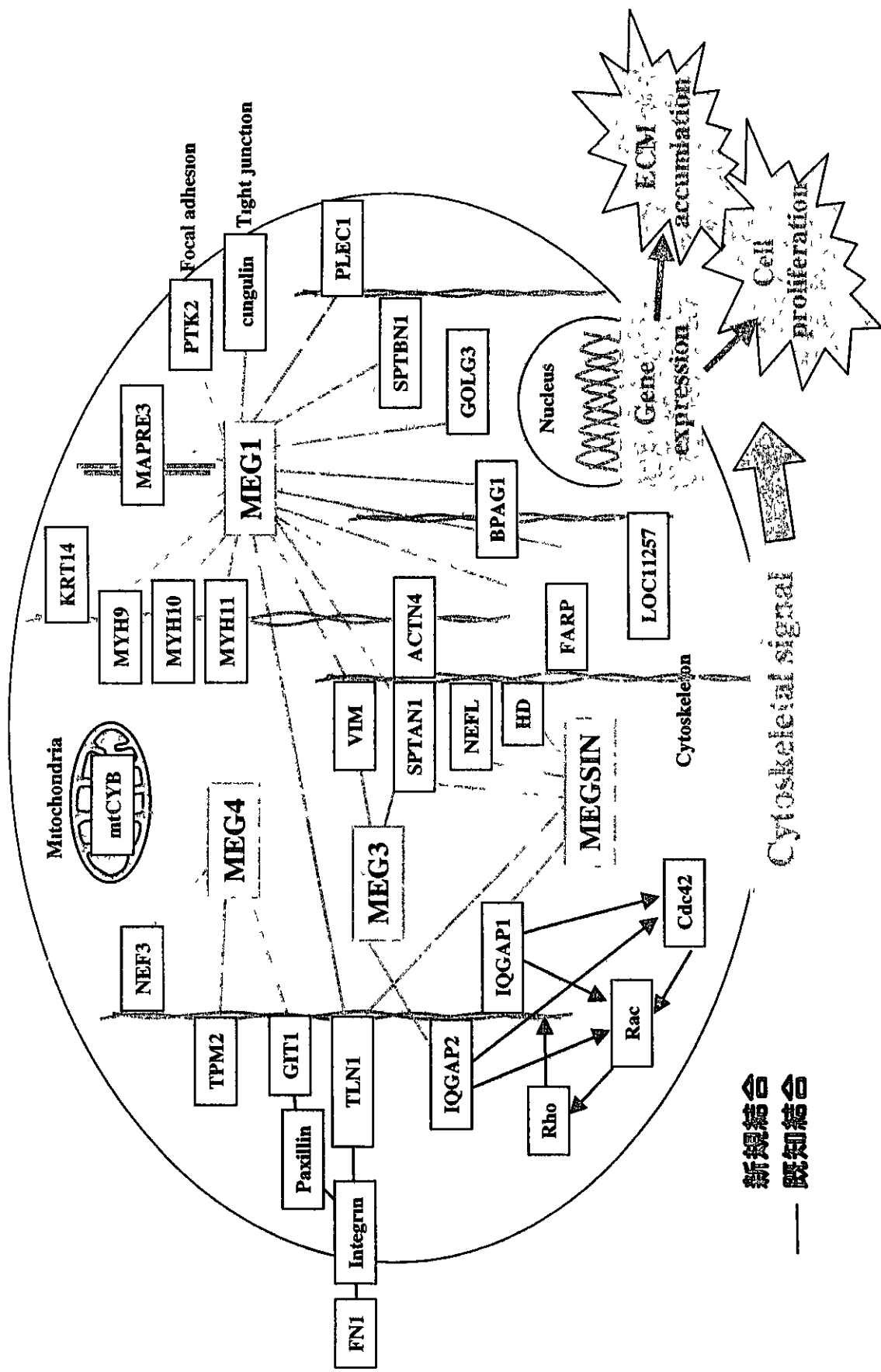


図3 メサンギウム細胞におけるメグシン,PP4Rmeg,meg-3, meg-4  
のネットワーク (酵母2ハイブリットスクリーニングによる)



厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

腎メサンギウム細胞高発現新規遺伝子群に関する研究  
(Meg-4 遺伝子欠損マウスの作製)

分担研究者 深水 昭吉 筑波大学先端学際領域センター 教授

研究要旨

我々はこれまでにヒトメサンギウム細胞に発現する遺伝子の定量的解析を世界に先駆けて報告し、その遺伝子 profile を他種の細胞のそれと比較して、5つの未知のメサンギウム細胞特異的遺伝子を見出すことに成功した。うち1つの新規遺伝子“Meg-4 (mesangial cell-specific gene 4)”は、翻訳領域が2322 bpであり、773 aaからなる機能未知のタンパク質をコードし、メサンギウム細胞で強く発現していることを確認している。スプライシングアイソフォームとしてN末端付近57-113 aa位の57 aa残基が欠損したクローンも存在すること、染色体マッピングによりヒトにおいては第10番染色体に存在すること、さらに、アミノ酸のモチーフ解析により、Meg-4はAAA-ATPase (ATPase Associated with Diverse Cellular Activities) ファミリーに属し、分子内にAAA motif (ATP binding motif を含む)、Zn-dependent metalloprotease motif を持ち、実際にATPase活性を持つことが判明している。今後、メサンギウム細胞の機能異常による糸球体の機能低下、さらには慢性腎炎との関わりなどメサンギウム細胞の生理機能や病態生理を分子レベルで考える上で極めて興味深い。

本研究では個体レベルにおけるMeg-4の生理機能の解明を目的とし、Meg-4遺伝子欠損マウスを作製した。

## 研究組織

### 研究協力者

石田 純治 筑波大学先端学際領域センター 助手

伊藤 維昭 京都大学ウイルス研究所 細胞生物学研究部門 教授

秋山 芳展 京都大学ウイルス研究所 細胞生物学研究部門 助教授

### A 研究目的

AAA-ATPase が関与する細胞機能は、タンパク質分解、膜融合、オルガネラの形成、転写制御などその名の通り多種多様である。その後のデータベース検索を用いた解析から Meg-4 はミトコンドリアに存在する AAA-プロテアーゼと相同性が高いことが明らかになった。AAA-プロテアーゼのミトコンドリアにおける生理機能については、何らかの原因で異常となった膜タンパク質を特異的に分解・除去して膜タンパク質の品質を管理するというプロテアーゼとしての働きのみならず、膜タンパク質複合体の形成などを補助する一種のシャペロンとしても機能することが示唆されている。さらに興味深いことに、ヒトの遺伝性疾患である遺伝性痙性対麻痺 (hereditary spastic paraplegia) の原因としてミトコンドリアの AAA-プロテアーゼが同定された。この疾患ではミトコンドリアの異常により神経細胞が変性し、進行性の衰弱や下腹部の麻痺が病状と

して現れる。

### B 研究方法

#### 1) Meg-4 の ATPase 活性

ヒト Meg-4 を maltose binding protein (MBP) との融合蛋白 (MBP-Meg4) として大腸菌に発現させ、maltose beads を用いて蛋白を精製、ATPase 活性をマラカイトグリーンを用いた無機リン酸定量法、あるいは酵素カップル法にて検討した。

#### 2) マウス Meg-4 遺伝子のゲノム DNA クローニング

遺伝子欠損マウスを作製するに当たり、ファージライブラリーを用いたマウス Meg-4 のゲノム DNA のクローニングを行った。ライブラリーとしては、C57BL/6 mouse Liver genomic library (EMBL3 SP6/T7・STRATAGENE 社) を用いた。Probe は、マウス腎臓の Total RNA から RT-PCR によりマウス Meg-4 cDNA の ATG~exon5 間 400 bp の領域を増幅することにより調製した。

#### 3) Meg-4 遺伝子欠損マウスの作製 マウスにおいて詳細な発現解析を



可能とするため、Meg-4 の翻訳領域と核移行シグナルを持つ *lacZ* 遺伝子とを置き換えたターゲットベクターを作製した。核移行シグナルを持つ *lacZ* 遺伝子を用いることにより、Meg-4 遺伝子の発現部位に関して、より鮮明で正確な知見が得られることが期待される。次に、高効率に生殖系列への分化が認められている TT2 ES (embryonic stem cell) 細胞を用いて、ES 細胞レベルでの遺伝子欠損を行った。サザンプロット解析による変異 ES 細胞選別の後、アルビノマウスの初期胚に変異 ES 細胞を注入することにより、キメラマウスを得、そのキメラマウスと野生型マウスと交配することによりヘテロ欠損マウス候補を得た。変異 ES 細胞の生殖系列への移行確認は、ヘテロ欠損マウス候補のゲノム DNA を回収し、サザンプロット法により行った。同定されたヘテロ欠損マウス同士の交配により Meg-4 遺伝子ホモ欠損マウスを作製する。

#### 4) Meg-4 遺伝子欠損マウスの解析

Meg-4 に関しては発生時期から成体を通じて、その発現部位や発現量はほとんど明らかになっていない。そこで Meg-4 遺伝子ヘテロ欠損マウスを用いてノーザン解析、RT-PCR 法、*in situ* hybridization 法のほか、*lacZ* 染色を行い詳しい発現解析を行う。

### C 研究結果及び考察

#### 1) Meg-4 の ATPase 活性

精製 MBP 融合 Meg-4 は 90 nmol ATP/hr/mg の ATPase 活性を有することが判明した。ちなみに、MBP 自身の活性は検出限度以下であった。

#### 2) マウス Meg-4 遺伝子のゲノム DNA クローニング

C57BL/6 マウスの肝臓由来ゲノムライブラリーに対して、マウス Meg-4 cDNA 内の翻訳開始点から 400 bp の DNA 断片をプローブとしてマウス Meg-4 ゲノムのクローニングを行った  $7.2 \times 10^5$  プラークのファージクローンをスクリーニングした結果、最終的に翻訳開始点 (ATG) を含むクローンとして 1 クローンが同定された。その後のマッピング、一部シーケンスの結果、マウス Meg-4 ゲノム配列の ATG から上流約 95 kb と下流約 32 kb が得られたことが判明した (図 1 参照)。さらに、データベース上のマウス Meg-4 mRNA 配列と、得られたゲノム配列とを比較した結果、ATG を含む exon は第 1 exon であることが推察された。第 1 exon は 198 bp の長さで、ATG の上流 (5' 非翻訳領域) が 163 bp、ATG の下流 (翻訳領域) が 35 bp であることが判明した。第 2 exon に当たる配列は、今回得られたクローンには含まれておらず、さらに下流にあるものと思われる。これら情報を元に詳しい制限酵素地図を作成し、遺伝子欠損のためのターゲットベクターを構

築した。

### 3) Meg-4 遺伝子欠損マウスの作製

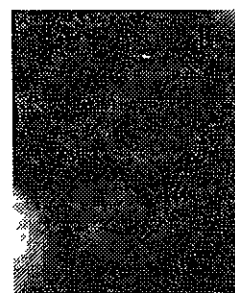
#### a) ターゲティングベクターの作製

Meg-4 遺伝子のターゲティングベクター作製に当たり、相同領域として翻訳開始点から上流約 6 kb、また、下流の相同領域として約 23 kb を用いた。また、詳しい発現解析を可能とするためマウス Meg-4 の翻訳開始点付近から約 400 bp の領域を、核移行シグナルを持つ LacZ 遺伝子 (NLS-LacZ) と置換し、ポジティブセレクションのためその下流にネオマイシン耐性遺伝子 (Neo<sup>r</sup>) を接続した。ネオマイシン耐性遺伝子は発現効率を上げるため逆向きに接続した。さらに、ネガティブセレクションのため相同領域の外側にジフテリア毒素 A 断片 (DT-A) を組み込んだ (図 2 参照)。

#### b) ES 細胞レベルにおけるターゲティング

相同組み換えのための ES 細胞は、C57BL/6 と CBA マウスの F1 胚より樹立した TT2 を用いた。TT2 は 8 細胞期胚にてインジェクションやアグリゲーションが行え、さらに高い寄与率のキメラマウスが得られ、高効率で生殖系列への移行が認められるという利点を持つ ES 細胞である。遺伝子型は XY であり、そのため高い寄与率のキメラマウスは雄となる。線状にしたターゲティングベクターを TT2 ES 細胞 ( $4.8 \times 10^7$  cells) へ電

気穿孔法にて導入し、ネオマイシン (G418) にてセレクションを行った。1 週間のセレクションの後、ネオマイシン耐性クローンを 254 クローン単離し、サザン解析により遺伝子欠損 (相同組み換え) 変異 ES 細胞を同定した。結果、Meg-4 遺伝子相同組み換え ES 細胞として、15 クローンが樹立された。

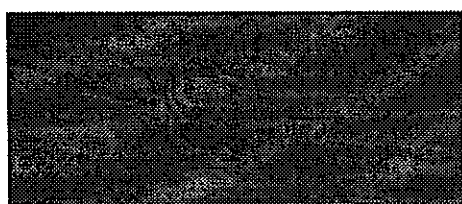


セレクション7日目の  
Meg4-ES 細胞コロニー

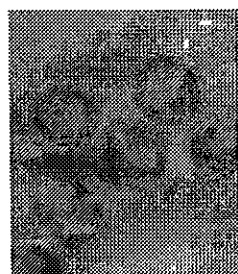
#### c) マウス受精卵への変異 ES 細胞の導入 (キメラマウスの作製)

相同組み換え体として樹立された Meg-4 遺伝子変異 ES 細胞のうち、細胞の形態が良いと判断した 4 クローンに関して、マウス個体への導入を試みた。ICR マウス (アルヒノ系統) の 8 細胞期胚にアクリゲーション法にて変異 ES 細胞を導入し (1 つの受精卵当たり 10~20 個の ES 細胞を導入)、胚盤胞まで発生が進んだ胚に関して、仮親の子宮内へ移植し、個体にまで発生させキメラマウスを作製した。4 クローンから樹立されたマウス系統の内、1 つの系統 (ライン 24) でキメラマウスでの ES 細胞の寄与率が高く、体毛の占有率で

ES 細胞由来が 80%以上の個体が 7 匹得られた。その内、ES 細胞由来の毛色寄与率が 90%以上の雄個体は 5 匹であり、この個体を用いてヘテロ欠損マウス作製の交配を行うこととした。残り 3 つの系統は ES 細胞の寄与率が低く、実際の交配によりヘテロ欠損マウスを得るのは困難であると考えられた。



8 細胞期胚への Meg4 ES 細胞のインジェクション



胚盤胞まで発生の進んだ Meg4 クローン

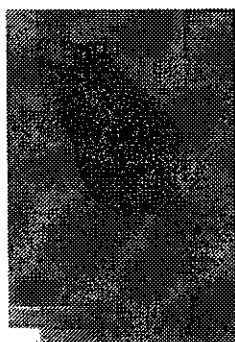
#### d) 相同組換え ES 細胞の生殖系列移行確認 (ヘテロ欠損マウスの作製)

90%以上のキメラ率を有する雄マウス 4 匹 (下図参照) と C57BL/6 マウス (雌) とを交配し、Meg-4 遺伝子ヘテロ欠損マウスの作製を試みた。ここで、雌として C57BL/6 マウスを用いたのは、今回用いた TT2 ES 細胞は先にも述べたとおり C57BL/6 マ

ウスと CBA マウスとの交配により得られる F1 胚より樹立されているため、両マウスの遺伝子座を有しているが、ターゲティングベクターに使用したゲノムが C57BL/6 由来であるため、C57BL/6 側の遺伝子座が欠損していると考えられるためである。交配の結果、8 腹の交配から 40 匹の出産仔を得た (平均産仔数 5 匹)。その後の離乳率は 77.5% (31 匹) であり、離乳個体の雌雄比は 1 対 2 であった。雌個体が高かったがその原因は現在のところ不明である。離乳個体の遺伝子型をサザンブロット解析により検定した結果 (図 3 参照)、31 匹の離乳個体の内、19 匹が野生型マウスであり、12 匹がヘテロ欠損マウスであると同定された。ヘテロ欠損マウスの比率が若干少ないものの、ほぼ 1 対 1 でヘテロ欠損マウスが得られたと考えている。雌雄別の集計により、雌雄に関係なく野生型マウスとヘテロ欠損マウスの比率もほぼ 1 対 1 であることを確認している。また、離乳前に死亡した個体の遺伝子型を調べた結果、こちらも野生型マウスとヘテロ欠損マウスの比率がほぼ 1 対 1 であった。このことは、Meg-4 遺伝子がヘテロで欠損していても胎性致死にはならないことを示唆している。しかしながら、平均産仔数が 5 匹という値は C57BL/6 マウスの平均産仔数 (8 匹前後) に比べると低いことが伺える。キメラマウスは ICR マウスと C57BL/6-CBA マウスとのモザイ

ク個体であることに起因する可能性もあるが、この産仔数の低下と Meg-4 遺伝子ヘテロ欠損との関連があるのかに関しては、今後のヘテロ欠損マウスを用いた交配実験により明らかになるものと思われる。さらに、現時点において野生型マウスとヘテロ欠損マウス間に成長速度の違いや形態学的な明らかな違いは観察されていない。

今後、得られたヘテロ欠損マウス同士を交配し、Meg-4 遺伝子ホモ欠損マウスを得、Meg-4 の生体内における生理機能の解明を目的とした解析を行うこととなる。



Meg4-キメラマウス

#### 4) Meg-4 遺伝子欠損マウスの解析

ヒトの各種臓器における Meg-4 の発現は、腎臓のみならず、骨格筋、心臓、脳などにも発現が認められ、特に骨格筋での発現が強く検出される。同様の発現パターンがヘテロ欠損マウスにおいても認められる。エネルギー産生の活発な筋肉での遺伝子高発現は Meg-4 がミトコンドリア

の機能に関与することを示唆するものと考えられる。

今後、ヘテロ、および、ホモ欠損マウスにおける、病理・組織学的解析を行うと共に、腎血流量の測定、さらに血漿および尿中成分を生化学的に解析し、腎機能について検討する。また Meg-4 欠損マウスは、ミトコンドリアの機能異常の可能性もあるため、エネルギー産生の活発な脳や筋肉などの組織に機能的・組織学的異常が生じていないか検討し、Meg-4 の生体内における生理機能を総合的に解析する。

#### D 結論

メサングウム高発現遺伝子のひとつである meg-4 に関して、その機能、さらには腎疾患治療・診断標的分子としての可能性を検討する上で有用なツールとなる meg-4 欠損マウス(ヘテロ)の作製に成功した。

#### E 研究発表

##### 論文

- 1 Hatta, M , Daitoku, H , Matsuzaki, H , Deyama, Y , Yoshimura, Y , Suzuki, K , Matsumoto, A , and Fukamizu, A. Regulation of alkaline phosphatase promoter activity by forkhead transcription factor FKHR Int J Mol Med 9, 147-152 (2002)