

I - 2 ヒト型 SR 発現マウスの開発と個体レベルでの 阻害薬効果の解析

富山大学・大学院医学薬学研究部 分子神経科学講座 助教 井上 蘭

【研究目的】

SR の阻害薬は、神経系疾患に対しては変性疾患やてんかん発作の新たな治療薬となりうると考えられる。また、皮膚ではバリア機能の維持や向上に寄与することが期待される。in silico スクリーニングにより見出したヒト SR に対する阻害薬候補19種を用いて、SR に対する阻害効果を in vitro で測定する過程で、ヒトSRに対する阻害効果を示す化合物とは異なる化合物がマウス SR に対して阻害効果を示すことが明らかとなった。また、ヒト SR (NCBI Accession: CAG33581.1) とマウス SR (NCBI Accession: CAI24252.1) のアミノ酸配列を比較すると、ヒト SR が340アミノ酸 (a.a.) から構成されるのに対し、マウス SR は、339 a.a.と1 a.a. 少なく、また、全体のアミノ酸配列の比較で、ヒトSR とマウス SR のアミノ酸同一性は、89%である。これらのことから、本研究で開発するヒト SR に対する阻害薬は、個体レベルでの活性検討の際に用いるマウス SR に対する効果が、ヒト SR とは異なる可能性がある。従って、本研究では、SR 阻害薬の効果を in vivo で検証するために、マウス SR をヒト SR に入れ替えたヒト型 SR を持つマウス系統を作製することを目的とする。

【研究方法と結果】

本研究では、マウス SR 遺伝子座にヒト SR (変異型 SR-C/D) 遺伝子を挿入した標的遺伝子組換えベクターを構築し、マウス胚性幹 (ES) 細胞に導入し、目的の遺伝子組換えが行われたES細胞からキメラマウスの作製により、ヒト型 SR 発現マウス系統を作製するものである。本年度は、遺伝子組換えベクターの構築を以下の方法で進めた。

1) 標的遺伝子組換えベクターの構築

マウス SR 遺伝子をヒト SR に置き換えるために、理研バイオリソースより、マウス SR ゲノム遺伝子配列をバクテリア人工染色体 (BAC) に含む大腸菌株 (B6Ng01-238C10) を入手した。大腸菌内での相同組み換え法を用い、マウス SR 遺伝子の翻訳開始 Met に、in vitro 酵素活性評価に用いているヒト SR cDNA (SR-C/D-His) を挿入するための研究を進めた。

BAC を含む大腸菌に、薬剤耐性マーカーとして、ゼオシン耐性かつストレプトマイシン感受性となる遺伝子断片を相同組み換えにより、マウス SR 遺伝子の翻訳開始 Met の位置に導入した。薬剤耐

性ならびに BAC に対する PCR 法で、正しく遺伝子が挿入されたクローンを選択した。ヒト SR とネオマイシン耐性遺伝子断片を構築し、目的の標的遺伝子組換えベクターが完成した (図 5)。また、C57BL/6 系統由来 ES 細胞 に導入し、標的遺伝子組換え細胞をサザンブロット解析によりスクリーニングし同定した (図 6)。

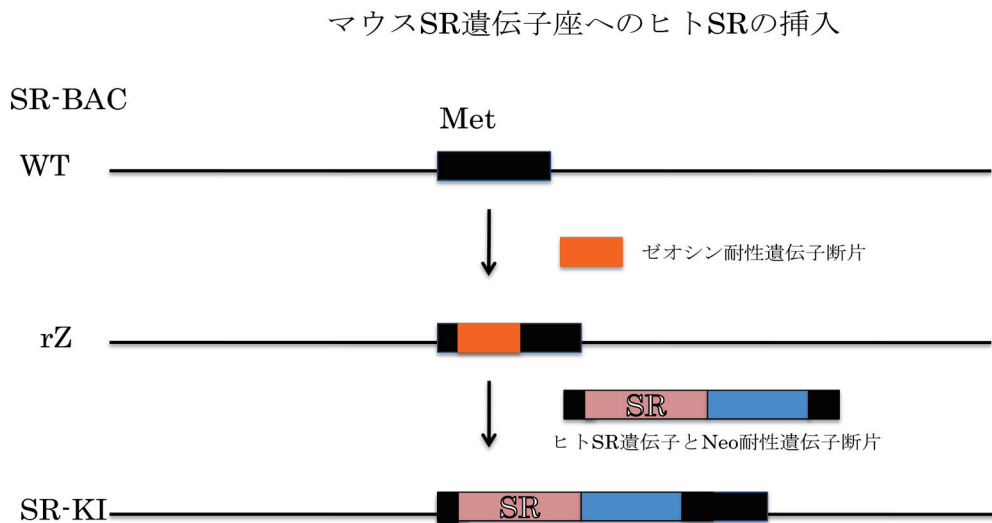


図 5 マウス SR 遺伝子座へのヒト SR 遺伝子の挿入方法の概略

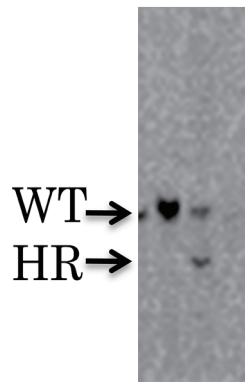


図 6 ES 細胞のサザンブロット解析の結果

標的遺伝子組換え細胞を選択するために、サザンブロット解析を実施した。WT が野生型遺伝子由来のバンド、HR が相同組換え由来のバンドを示し、HR バンドを有する細胞にはヒト SR-C/D が挿入されている。

【考察と今後の展望】

ヒト型 SR 発現マウス系統作製のための、標的遺伝子組換えベクターの構築を終え、遺伝子組換えベクターは完成した。また、ES 細胞に導入して、目的の遺伝子組換えが起きたクローンを得たので、マウス系統作製を進める。