

Large Maf 群転写因子 MafB 臓器特異的遺伝子欠損マウスの作製；膵内分泌細胞における機能解析

藤澤 空見子 (筑波大学 生物学類) 指導教員：高橋 智 (筑波大学 医学医療系)

背景・目的

今日、日本における糖尿病患者数は約 250 万人程度と見積もられている。糖尿病は主に 1 型と 2 型に分けられ、それぞれの原因は、1 型では免疫機序による膵島β細胞の破壊・消失、2 型ではインスリン分泌や抵抗性に関わる複数の遺伝因子に肥満やストレス、生活習慣等の環境要因が加わることでされている。患者数は 2 型が圧倒的に多い。治療としては、食事療法、運動療法に加え、様々な経口血糖降下薬、インスリン注射、時に膵島移植が用いられている。しかし、体内の血糖値状態に応じたインスリン量の調節を外部から適切に行うことは難しく、また、移植も拒絶反応という欠点があり、治療として改善の余地が残されている現状である。

本研究では、Large Maf 群転写因子の 1 つである *MafB* に着目した。*MafB* は様々な組織で発現しているが、内分泌細胞分化においても重要な役割を果たし、β細胞形成になくはならない遺伝子の 1 つである。このβ細胞の分化成熟メカニズムは未だ完全には分かっておらず、解明が進めば糖尿病治療法開発に繋がる可能性がある。これまでの解析により、全身性の *MafB* 遺伝子欠損マウスは、呼吸障害により生後数時間で死亡する事が明らかになっており、成獣における *MafB* 遺伝子の機能解析は困難であった。本研究では、成獣におけるβ細胞機能の解析を行うために、*MafB* を膵β細胞特異的に欠損する条件付き遺伝子欠損マウスの作製を試みた。

材料・方法

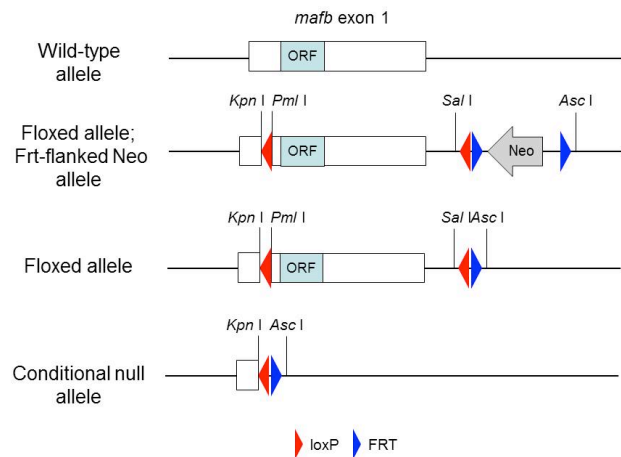
(1)キメラマウスの作製。相同組み換えによって、*MafB* 遺伝子領域を loxP 配列で挟んだ遺伝子改変 ES 細胞 (C57BL/6J マウス由来) を作製した。この ES 細胞と ICR マウスの 8 細胞期胚とのアグリゲーションキメラ胚を作製し、その後仮親の子宮に移植した。

(2)flox/+マウスの作製。得られたキメラマウスを野生型 C57BL/6 マウスと交配することで、生殖系列への移行を確認し、flox/+マウスの作製を行った。その後、Flpe マウスと交配し、ネオマイシン耐性遺伝子の排除を行った。

(3)Cre 組換え酵素による flox *MafB* アリルの切り出し。得られた flox/+マウスの floxed *MafB* アリルが Cre 組換え酵素によって、有効に切り出されるか確認を行った。flox/+; *Ayu1-Cre* マウスを作製し、マウスゲノムを抽出、MafB 欠損アリルを特異的に認識可能なプライマーを用いた PCR を行って、*MafB* 遺伝子が欠損するか判定を行った。

(4) flox/+; *Ins1-Cre* マウスの作製。一方でβ細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現可能な *Ins1-Cre* マウスと flox/+マウスを交配することで、β細胞特異的 *MafB* 遺伝子欠損マウスが効率良く得られる交配に必要なマウスを用意した。

これらのマウス交配には、全て C57BL/6J マウスを用いた。また、各交配で生まれたマウスは、PCR によって、遺伝子型の判定を行い、該当するもののみを次の交配に用いた。

mafB (chromosome 2)

結果

PCR 法によって、キメラマウスと野生型マウスの F1 世代に、floxed *MafB* 遺伝子型を有する事を確認し、生殖系列への移行を確認した。さらに、この F1 マウスを ES 細胞の選択の際に用いたネオマイシン耐性遺伝子を除去するために、Flpe マウスと交配する事で、F2 世代を作製し、ネオマイシン耐性遺伝子除去した。F2 世代はネオマイシン耐性遺伝子の欠損、ネオマイシン耐性遺伝子除去のために挿入した *Flp* 遺伝子、そして floxed *MafB* の確認によって、ヘテロマウス (Flox/+マウス)であることを確認した。さらに、flox/+; *Ayu1-Cre* マウスを作製し、*MafB* 遺伝子欠損アリル特異的な PCR によって、*MafB* 遺伝子がヘテロ接合性であることを確認し、loxP 配列が有効に Cre 組換え酵素による認識を受けることが明らかとなった。現在、さらにヘテロマウス同士の交配を行って floxed allele をホモとして持つマウス (flox/flox マウス)を作製中である。

一方で、β細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現可能な *Ins1-Cre* マウスと flox/+マウスを交配する事で、flox/+; *Ins1-Cre* マウスを得た。

考察

F1 マウスの解析から、改変 ES 細胞は、生殖系列に移行しており、ネオマイシン耐性遺伝子の除去も可能であったことから、flox/flox マウスの作製可能な事が確実となった。Flox/+; *Ayu1-Cre* マウスの解析から、挿入した loxP 配列は、Cre 酵素に適切に認識、切断を受けており、デザイン通りに機能することが明らかとなった。今後、flox/flox マウスおよび flox/+; *Ins1-Cre* マウスの交配を行って、β細胞特異的 *MafB* 遺伝子欠損マウスを得る予定である。

これまでの全身性 *MafB* 遺伝子欠損マウスの解析によって、*MafB* 遺伝子がβ細胞分化に重要な役割を有する事が明らかとなっている。今後、β細胞特異的 *MafB* 遺伝子欠損マウスの解析を行う事で、β細胞成熟への関与、また糖尿病発症の有無を検討する。