

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

Ⅲ. 分担研究者の報告書

1. トリプトファン-NAD変換系の分子生物学的解析

分担研究者 福岡伸一 青山学院大学理工学部 教授

研究要旨

食餌性NADの必要量を決定するためには、トリプトファンから変換されて合成される内的なNADの変換効率を正確に知り、これを差し引いた上で策定する必要がある。これまでになされた多数の研究から変換効率が推定されているが、いずれも直接的な方法ではない。ここでは分子生物学的な方法によって、トリプトファンからNADが変換される代謝経路（*de novo* 合成系）の鍵酵素であるキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ（Q P R T）遺伝子を人為的に欠損させたマウス（Q P R Tノックアウトマウス）を作出することを試みた。内的なNAD変換をゼロにしたこの動物モデルは食餌性NAD必要量の決定に重要な知見を提供できる。今年度は、マウスQ P R T遺伝子の解析、ノックアウトコンストラクトの作成、組み換えE S細胞の選抜およびキメラマウス作成を行った。

A. 目的

食餌性 NAD の必要量を決定するためには、トリプトファンから変換されて合成される内的な NAD の変換効率を正確に把握し、これを差し引いた上で策定する必要がある。これまでになされた多数の研究から変換効率は推定されているものの、いずれも直接的な方法ではない。正確な食餌性 NAD の必要量を明らかにするためには、トリプトファンから NAD に変換する経路 (de novo 合成系) を完全に遮断した上で、食餌性 NAD のみの寄与を測定することが重要であると考えた。その de novo 合成系の律速酵素として機能しているのが QPRT (キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ; EC2.4.2.19) である。QPRT は、de novo 合成系においてキノリン酸から NaMN (ニコチンアミドモノヌクレオチド) に変換する反応を触媒している。ヒト¹⁾において、QPRT の一次構造が明らかにされ、297 のアミノ酸からなり、肝臓、腎臓、そして脳に局在することが確認されている。また、マウスでの脳における QPRT 遺伝子発現量及び QPRT 活性は、ともに肝臓の 1%未満とされている²⁾。本研究では、内的 NAD 変換を遮断する目的で QPRT 遺伝子を人為的に欠損させたマウス (QPRT ノックアウトマウス) を作出することを試みた。今年度は、マウス QPRT 遺伝子の解析、ノックアウトコンストラクトの作成、組み換え ES 細胞の選抜およびキメラマウス作成を実施するとともに、ジェノタイピング法による遺伝子型解析法を確立した。

B. 研究方法

マウス QPRT ゲノム解析

シーケンシングによって決定したマウス QPRT 遺伝子の cDNA 配列をアミノ酸配列に変換し、エキソンの分岐位置を推定した。次に、イントロン部分の解析を行うために各エキソン上にプライマーを設計し、ICR マウスのゲノム DNA をテンプレートに LA PCR を行った。PCR は LA Taq (TaKaRa) を使用し、94℃ 1 分の熱変性の後、98℃ 20 秒、68℃ 20 分を 30 サイクル、72℃ で 10 分間反応させた。PCR 増幅産物を電気泳動で確認した後、検出したバンドについて SUPREC-01 (TaKaRa) を用いて精製し、各エ

キシソンプライマーでシーケンス解析を行った。解析により決定した塩基配列を基に新たにプライマーを作製し、順次シーケンシングを繰り返すことによってイントロン部分の解析を行った。

QPRT 遺伝子ターゲティングベクターの構築

QPRT 遺伝子ターゲティングベクターの 5'相同領域のゲノム DNA フラグメントをクローニングするために、このゲノム DNA をもとに PCR プライマーを設定した。ターゲティングを受けた QPRT 遺伝子座からのタンパク質合成がエキソン 1 でストップするように、リバープライマーにインフレームの翻訳停止コドンを導入した。このプライマーの組み合わせで、マウス ES 細胞から調製したゲノム DNA をテンプレートにして、LA Taq (TaKaRa) を用いて 5'相同領域のゲノム DNA フラグメントを増幅した。その PCR 産物を TA クローニングベクター (pGEM-T Easy, Promega) にサブクローニングし、シーケンス解析を行って目的のゲノム DNA であることを確認した。

一方、ターゲティングベクターの 3'相同領域は 129 系マウスの QPRT 遺伝子、エキソン 4 を含む 4.3 kb のゲノム DNA クローンを使用した。

制限酵素を用いてこれらのプラスミドクローンから 3'および 5'相同領域のゲノム DNA フラグメントを切り出して、1%アガロースゲル電気泳動によりベクターと分離させ、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて相同領域の DNA フラグメントをそれぞれ精製した。これらの DNA フラグメントを順次、PGK- β -geo フラグメント、および MC1-diphtheriatoxin A 遺伝子を持つプラスミドベクターにサブクローニングし、QPRT 遺伝子ターゲティングベクターを構築した。

ES 細胞への QPRT 遺伝子ターゲティングベクターの導入と G418 耐性株の樹立

QPRT 遺伝子ターゲティングベクターを QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を用いて精製し、Kpn I により直鎖状にしたものを ES 細胞への導入に用いた。不活性化処理したマウス胎児繊維芽細胞をフィーダー細胞にして、129Sv/J マウス由来 ES 細胞 (Genome Systems) および、129Sv マウス由来 ES 細胞

(Cell & Molecular Technologies)を培養した。1.0×10⁷個のES細胞をエレクトロポレーションバッファー500 µlに懸濁し、40 µgの直鎖にした QPRT 遺伝子ターゲティングベクターを加えて、室温で5分間インキュベートした。その後、0.4 cmのギャップのジーンパルサーキューベット (BIO-RAD)にES細胞懸濁液を加え、ジーンパルサー II (BIO-RAD)を用いて、電圧240V、キャパシタンス500 µFでエレクトロポレーションを行った。PGK/Neo 遺伝子のトランスジェニックマウス由来の胎児繊維芽細胞をフィーダー細胞にして、40~60%の生存率のES細胞を一晩培養し、その後は250 µg/mlのG418を含む培地を1日2回ずつ交換しながら7日間培養した。これらのコロニーをピックアップして培養することにより、ターゲティングベクターが導入されたES細胞をクローニングした。これらのES細胞株を凍結保存するとともに、さらにフィーダー細胞の上に継代して増殖させ、それぞれの細胞株からゲノムDNAを抽出しG418耐性ES細胞株のサザンおよびPCRスクリーニングを行い、ターゲティングを受けたQPRT遺伝子座を持つ細胞株を選択した。

キメラマウスの作製

ES細胞を回収して4℃で1時間以上冷却した後、ピエゾマニピュレーターを用い

てC57BL/6N系統マウス（日本チャールズリバー）の子宮に移植した。分娩後3週を過ぎた時点で得られた産子を離乳させ、ES細胞を注入した宿主胚であるC57BL/6N系統マウスの黒毛とは異なった毛色、あるいは毛色が混ざった産子をキメラマウスと同定した。さらに、毛色におけるその混合率を判定して、ES細胞のキメラマウス個体に対する寄与率を評価した。

ジェノタイプピング法の確立

まず、QPRT 遺伝子検出用プライマー7種類及びネオマイシン耐性遺伝子配列(neo)特異的プライマー6種類を設計した。ICRマウスならびにGP-2 ノックアウトマウスのヘテロ型から抽出したゲノム溶液を約25 µg/lになるようにTEで希釈した。PCR 1反応あたり、Ex taqTM (5 U/µl TaKaRa 京都)を0.25 µl、10×Ex taqTM buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 % Tween 20, 0.5 %

Nonident P-40, 50 % Glycerol TaKaRa 京都)を5 µl、dNTP (各2.5 mM TaKaRa 京都)を4 µl、senseプライマー (20 µM) と anti-senseプライマー (20 µM)それぞれ1 µl、ゲノム溶液 (約25 µg/µl)を2 µl、MilliQを36.75 µlそれぞれを混ぜ、計50 µlとした。その際、QPRTase プライマーの条件検討に関しては、ICRマウスから抽出したゲノム溶液を利用した。また neo プライマーの条件検討に関しては、GP-2 ノックアウトマウスから抽出したゲノム溶液を利用した。調製したPCR溶液を用いてPCRを行なった。PCR条件は94℃ 30秒を1サイクル後、94℃ 30秒、65℃ 30秒、72℃ 30秒を計35サイクル行なった。PCR産物を4%アガロースゲルにて電気泳動を行なった。このPCR条件で数本のバンドが見られたプライマーセットについて、同じ組成のPCR溶液を用いてアニーリング温度を65℃から70℃の間で変化させ、PCRを行ない最適条件を導いた。

C. 結果

マウス QPRT ゲノム解析

マウス QPRT ゲノム解析を行った結果、4つのエクソンからなることが判明した。また、マウスゲノムプロジェクトで公開されているゲノム配列と比較した結果、マウス QPRT 遺伝子は、マウス7番染色体F4領域の存在していることが明らかになった(図1)。それらの領域の全シークエンスを解明した。

ターゲティングベクターの作製とキメラマウスの作出

これらの解析結果をもとに、QPRT 遺伝子のエクソン2から3の領域をβ-galactosidase/Neomycin phosphotransferase 遺伝子と組み換えたジーンターゲティングベクターを構築した(図2)。このターゲティングベクターをES細胞に導入し、サザン解析、ゲノムPCRによるスクリーニングを行い、変異型ES細胞クローンを確立した。以降、上記方法に記載したごとくキメラマウスを作製した結果、計14匹のキメラマウスが産まれ、そのうち3匹がES細胞の寄与率が高かった。

ジェノタイプピング法の確立

QPRT 遺伝子検出用プライマー7種類を

設計し (表 1), ジェノタイピングの条件検討を行った。その結果, S1×AS1, S2×AS1, S4×AS3 のプライマーセットにおいて, 初期に設定した. PCR 条件 (94 °C 30 秒を 1 サイクル後, 94 °C 30 秒, 65 °C 30 秒, 72 °C 30 秒を計 35 サイクル) で特異的なバンド以外に非特異的なバンドも見られた。それ以外のプライマーセットにおいては特異的なバンドのみが検出された。非特異的なバンドが検出された 3 つのプライマーセットにおいてアニーリング温度を 65 °C から 70 °C に変化させた PCR 条件で PCR を行なった。しかし, アニーリング温度を変化させても 3 つのプライマーセットで非特異的なバンドが見られた (図 3)。このことから 7 ペアー中 4 ペアー (S3×AS1, S1×AS2, S3×AS2, S3×AS3) が使用可能だということが判明した。

次に, ネオマイシン耐性遺伝子(neo)検出用プライマーを 6 種類設計した (表 2)。neo プライマーは設計した 6 ペアー全て目的の特異的なバンドのみが検出された (図 4)。よって neo プライマーは 6 ペアー全て使用可能だと判断した。

これら使用可能な QPRT プライマーならびに neo プライマーを組み合わせることで QPRT ノックアウトマウスの遺伝子型解析ができると判断した。

D. 考察

本研究は, 食餌性 NAD 必要量の決定するために, トリプトファンから NAD に変換される代謝経路 (de novo 合成系) の鍵酵素であるキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (QPRT) 遺伝子を人為的に欠損させたマウス (QPRT ノックアウトマウス) を作出することを試みた。内的な NAD 変換を遮断したこの動物モデルは食餌性 NAD 必要量の決定に重要な知見を提供できる。今年度は, マウス QPRT 遺伝子の解析, ノックアウトコンストラクトの作成, 組み換え ES 細胞の選抜を行い, それからキメラマウスを作出し, 成功した。現在, F1 世代ヘテロミュータントマウスを鋭意作成中である。また, ノックアウトマウスを安定して供給できるシステムを構築する一環として, マウス尾部組織を用いジェノタイピングの実験系の確立を行った。この実験には, 当

研究室が既に今回と同様な方法で作出した GP2 ノックアウトマウスを用いることにより可能になった³⁾。このマウスのゲノム DNA 中には, ターゲティングベクター由来の PGK-β-geo 遺伝子配列を有しているため, ヘテロ型, ホモ型を確定する条件を見出すことが可能になる。その結果, ジェノタイピング法の条件検討が完了し, ジェノタイピングが可能になった。

E. 健康危機情報

特記する情報なし

F. 研究発表

1. 発表論文

Kobayashi K, Yanagihara K, Ishiguro K, Fukuoka S. (2004) GP2/THP gene family of self-binding, GPI-anchored proteins forms a cluster at chromosome 7F1 region in mouse genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322** 659-64.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許予定

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 引用文献

1. Fukuoka S, Nyaruhucha M, Shibata K. (1998) Characterization and functional expression of the cDNA encoding human brain quinolinate phosphoribosyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* **1395**, 192-201.
2. Fukuoka S, Ishiguro K, Yanagihara K, Tanabe A, Egashira Y, Sanada H, Shibata K. (2002) Identification and expression of a cDNA encoding human alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase (ACMSD). A key enzyme for the tryptophan-niacine pathway and "quinolinate hypothesis". *J Biol Chem.* **277**, 35162-7.
3. Kobayashi K, Yanagihara K, Ishiguro K, Fukuoka S. (2004) GP2/THP gene family

of self-binding, GPI-anchored proteins forms a cluster at chromosome 7F1 region in mouse genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322** 659-64.

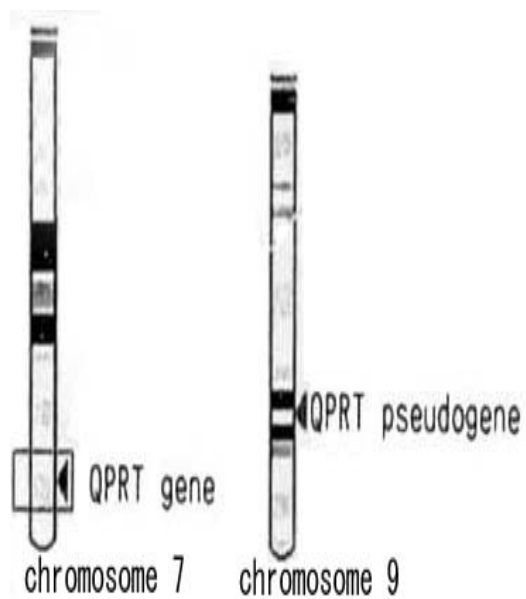


図1. マウス QPRT 遺伝子の染色体マッピング
マウス QPRT 遺伝子 (QPRTgene) は, マウス 7 番染色体 F4 領域に存在していることが判明した. また, マウス 9 番染色体上に QPRT 偽遺伝子(QPRT pseudogene)の存在が明らかになった.

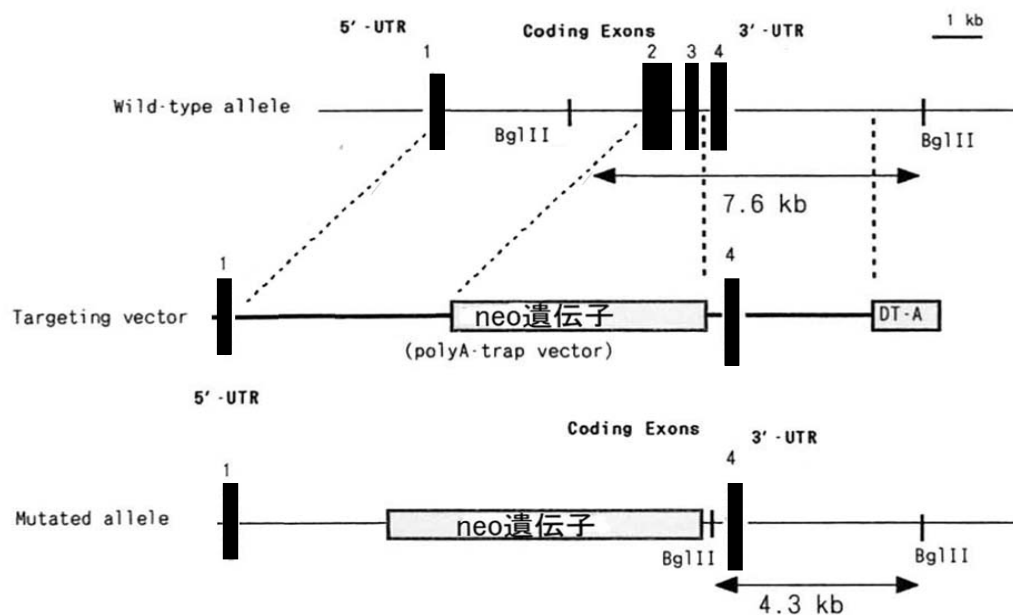


図2 マウス QPRT 遺伝子のターゲティングストラテジー

表 1 マウス QPRT 遺伝子検出用プライマー

name	プライマー配列 (5'→3')
S1	CGACACCTGGGTTCCGACTGGT
S2	GGACCTGCCCACCACCTGCTCT
S3	GCTCCTGTTACCCCCTACAACC
S4	AGGTGGCAGAGGTCAAGGGACC
AS1	GGCTGCTACATTCCACCTCTAC
AS2	CCTGCCGAGCCTTCAGCACTGC
AS3	GTCCAGCATTACCAGGTCAGCC

表 2 ネオマイシン耐性(neo)遺伝子検出用プライマー

name	プライマー配列 (5'→3')
F	TGGGCACAACAGACAATCGG
F2	AGCGAACCGGAATTGCCAGC
F3	CAAGACCGACCTGTCCGGTG
R	ACTTCGCCCAATAGCAGCCAG
R2	ACGCTATGTCCTGATAGCGGT
R3	CGACGAGATCCTCGCCGTCG

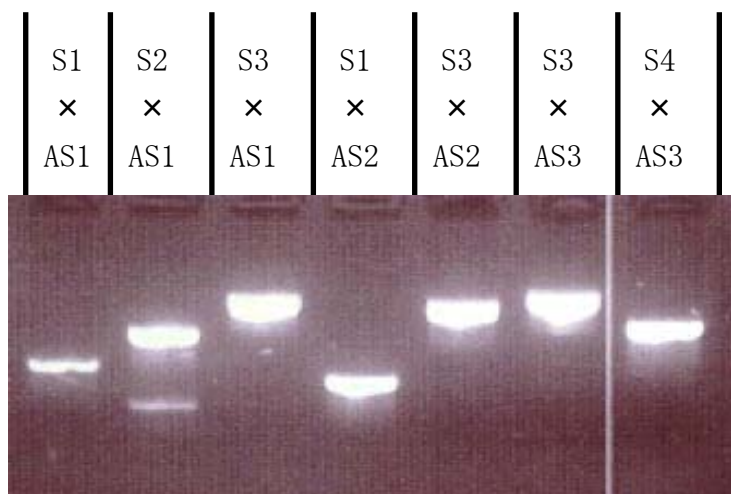


図3 QPRTase プライマーによる PCR 結果

S1×AS1、S2×AS1、S4×AS3 プライマーセットはアニーリング温度を 70 °C に設定。その他は 65 °C に設定。

S1×AS1、S2×AS1、S4×AS3 プライマーセットでは非特異的なバンドも検出された。

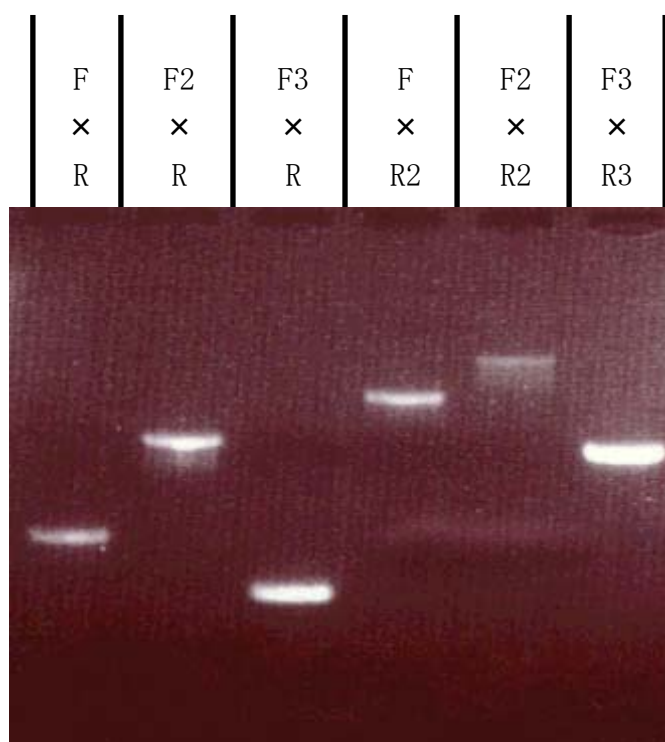


図4 neoプライマーによるPCR結果

すべてアニーリング温度を65 °Cに設定。