



# Inhibition of class II MHC gene expression by anti-sense RNA in transgenic mice

三木, 信彦

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1993-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1142

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001142>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	三 木 信 彦 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	博い第817号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成5年3月31日
学位論文題目	Inhibition of class II MHC gene expression by anti-sense RNA in transgenic mice トランスジェニックマウスにおけるアンチセンス RNA による クラス II 主要組織適合遺伝子発現抑制
審査委員	主査 教授 徳久剛史 教授 横山光宏 教授 伊東宏

### 論文内容の要旨

〔目的〕 アンチセンス RNA は培養細胞及びトランスジェニック動物における遺伝子発現抑制に有用であることが既に示されている。しかしその作用機序については種々の報告があり詳細は不明である。原核細胞ではアンチセンス RNA はセンス RNA と複合体を形成しリボソームにおける翻訳を阻害していることが報告されている。真核細胞ではセンス RNA がアンチセンス RNA と複合体を形成することによりセンス RNA の核外への輸送が障害されるという報告や、二本鎖 RNA 複合体は非常に不安定であり核内で急速に破壊されるという報告がある。これらのことから、アンチセンス RNA は細胞種によって異なったメカニズムで遺伝子発現調節を行なっていると考えられている。

幡野らは、主要組織適合抗原のひとつである I-A 分子  $\beta$  鎖に対するアンチセンス RNA を用いてマウス B リンパ腫細胞において、I-A 分子の遺伝子発現調節が可能であることを報告した。そこで私達は上記の In vitro 系で効果があった I-A 分子  $\beta$  鎖に対するアンチセンス RNA をマウス受精卵に導入してトランスジェニック動物を作成した。その結果、マウスのリンパ球においてもアンチセンス RNA が I-A 分子の発現を抑制することを明らかにした。今回、このアンチセンストランスジェニックマウスを用いて、正常 B 細胞内におけるアンチセンス RNA の遺伝子発現抑制機序を解析した。

〔方法〕 BALB/c マウス由来の I-A 分子  $\beta$  鎖をコードする cDNA の開始コドンを含む 100 塩基対をヒト  $\beta$  アクチン遺伝子プロモーターの支配下にアンチセンスの方向に組み換えた。このアンチセンス DNA を C57BL/6 マウスの受精卵にマイクロインジェクション法にて導入しトランスジェニック動物 (AS #34, AS #115) を得た。AS #34 及び AS #115 の生後 6 週令の子孫由来の脾臓細胞をモノクローナル抗 I-A 抗体及び抗 B220 抗体 (B 細胞と反応する) で二重染色し、フローサイトメ

リーにてB細胞表面上のI-A分子量を半定量した。また脾細胞由来RNA中のアンチセンスRNA量、I-A $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖センスRNA量をRNaseプロテクション法を用いて定量し比較検討した。

#### {結果}

1) AS#34及びAS#115系統のマウスの脾細胞由来B細胞表面のI-A分子量をフローサイトメトリーにて半定量した。その結果、I-A陽性のB細胞数(R1)とI-A陰性のB細胞数(R2)の比率(R1/R2)はAS#34、AS#115マウスいずれの子孫においても正常対照マウスに比較し減少していた(0.8、1.1vs2.9)。このことからAS#34及びAS#115マウス由来のB細胞表面のI-A分子の発現が抑制されていると考えられた。

2) I-A分子の量を調べた脾細胞由来の粗RNA中におけるアンチセンスRNA量をRNaseプロテクション法にて解析した。その結果、AS#34マウスはAS#115マウスに比し約4倍量のアンチセンスRNAを発現していた。さらにアンチセンスRNA量に相関してI-A $\beta$ 鎖センスRNA量の減少を認めた。I-A分子は $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖の2分子より構成されていることからI-A分子の発現しているB細胞を含む脾臓由来の粗RNA中にはこれら2つの鎖のセンスRNAは等量発現していると考えられる。そこで、I-A $\beta$ 鎖センスRNAの減少を認めた粗RNA中の $\alpha$ 鎖センスRNA量を定量したところ、AS#34ではI-A分子 $\beta$ 鎖センスRNA量のみ減少を認め、I-A分子 $\alpha$ 鎖センスRNA量は正常マウス由来の脾臓細胞と同量であり減少は認めなかった。

3) AS#115マウスにおいて外因性のアンチセンスRNAに関してホモ及びヘテロ接合体を作成し2)と同様の検討をした。その結果、ホモ接合体由来の脾臓細胞中にはヘテロ接合体のそれに比し約2倍量のアンチセンスRNAの発現が認められた。このアンチセンスRNA量の増加に相関してこれらのマウスではI-A分子 $\beta$ 鎖センスRNA量の減少を認めた。しかしI-A分子 $\alpha$ 鎖センスRNA量には変化が認められなかった。また細胞表面I-A分子量もI-A分子 $\beta$ 鎖センスRNA量と相関していた。

{考案} 生体内におけるアンチセンスRNAの遺伝子発現抑制の機序はいまだ明かにされていない。すでに2例のアンチセンスRNAを発現するトランスジェニックマウスにおいてその遺伝子発現抑制が報告されている。しかしそれらはいずれもセンス及びアンチセンスRNA量の相関については言及していない。今回、我々の検討では、アンチセンスRNA量の増加とセンスRNA量の減少の間に明らかな相関を認めた。さらにアンチセンスRNA量と翻訳されたタンパク量との間にも相関を認めたことから、生体内においてセンスRNAとアンチセンスRNAの複合体は細胞内で急速に破壊されていると考えられた。既に内因性アンチセンスRNAにてセンスRNAの減少を認めることは、Dictyostelium discoideumにて既に報告されている。さらにXenopus embryoへのアンチセンスRNAのマイクロインジェクションによってセンスRNAの減少を認めるという報告もある。これらのことから生体内におけるアンチセンスRNAによる遺伝子発現抑制機序は、センスRNAがアンチセンスRNAと複合体を形成することにより消化されてしまうためであると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

アンチセンス RNA は培養細胞及びトランスジェニック動物における遺伝子発現抑制に有用であることが既に示されている。しかしその作用機序については種々の報告があり詳細は不明である。既に幡野らは、主要組織適合抗原のひとつである I-A 分子  $\beta$  鎖に対するアンチセンス RNA を用いてマウス B リンパ腫細胞において、I-A 分子の遺伝子発現調節が可能であることを報告した。さらに私達は上記の *In vitro* 系で効果があった I-A 分子  $\beta$  鎖に対するアンチセンス RNA をマウス受精卵に導入してトランスジェニック動物を作製した。その結果、マウスの B リンパ球においてもアンチセンス RNA が I-A 分子の発現を抑制することを明らかにした。そこでアンチセンストランスジェニックマウスを用いて、正常 B 細胞内におけるアンチセンス RNA の遺伝子発現抑制機序を解析した。

方法は BALB/c マウス由来の I-A 分子  $\beta$  鎖をコードする cDNA の開始コドンを含む 100 塩基対をヒト  $\beta$  アクチン遺伝子プロモーターの支配下にアンチセンスの方向に組み換えた。このアンチセンス DNA を C57BL/6 マウスの受精卵にマイクロインジェクション法にて導入しトランスジェニック動物 (AS #34, AS #115) を得た。AS #34 及び AS #115 の生後 6 週令の子孫由来の脾臓細胞をモノクローナル抗 I-A 抗体及び抗 B220 抗体 (B 細胞と反応する) で二重染色し、フローサイトメトリーにて B 細胞表面上の I-A 分子量を半定量した。また脾細胞由来の RNA 中のアンチセンス RNA 量、I-A  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖センス RNA 量を RNase プロテクション法を用いて定量し比較検討した。その結果 I-A 陽性の B 細胞数 (R1) と I-A 陰性の B 細胞数 (R2) の比率 (R1/R2) は AS #34, AS #115 マウスいずれの子孫においても正常対照マウスに比較し減少していた (0.8, 1.1 vs 2.9)。このことから AS #34 及び AS #115 マウス由来の B 細胞表面の I-A 分子の発現が抑制されていると考えられた。

次に I-A 分子の量を調べた脾細胞由来の粗 RNA 中におけるアンチセンス RNA 量を RNase プロテクション法にて解析した。その結果、AS #34 マウスは AS #115 マウスに比し約 4 倍量のアンチセンス RNA を発現していた。さらにアンチセンス RNA 量に相関して I-A  $\beta$  鎖センス RNA 量の減少を認めた。I-A 分子は  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖の 2 分子より構成されていることから I-A 分子の発現している B 細胞を含む脾臓由来粗 RNA 中にはこれら 2 つの鎖のセンス RNA は等量発現していると考えられる。そこで、I-A  $\beta$  鎖センス RNA の減少を認めた粗 RNA 中の  $\alpha$  鎖センス RNA 量を定量したところ、AS #34 では I-A 分子  $\beta$  鎖センス RNA 量の減少を認め、I-A 分子  $\alpha$  鎖センス RNA 量は正常マウス由来の脾臓細胞と同量であり減少は認めなかった。また、AS #115 マウスにおいて外因性のアンチセンス RNA に関してホモ及びヘテロ接合体を作成し 2) と同様の検討をした。その結果、ホモ接合体由来の脾臓細胞中にはヘテロ接合体のそれに比し約 2 倍量のアンチセンス RNA の発現が認められた。このアンチセンス RNA 量の増加に相関してこれらのマウスでは I-A 分子  $\beta$  鎖センス RNA 量の減少を認めた。しかし I-A 分子  $\alpha$  鎖センス RNA 量には変化が認められなかった。また細胞表面 I-A 分子量も I-A 分子  $\beta$  鎖センス RNA 量と相関していた。

以上の結果から、アンチセンス RNA 量の増加とセンス RNA 量の減少の間に明らかな相関を認め

た。さらにアンチセンス RNA 量と翻訳されたタンパク量との間にも相関を認めたことから、生体内においてセンス RNA とアンチセンス RNA の複合体は細胞内で急速に破壊されていると考えられた。既に内因性アンチセンス RNA にてセンス RNA の減少を認めることは、*Dictyostelium discoideum* の系にて既に報告されている。さらに *Xenopus embryo* へのアンチセンス RNA のマイクロインジェクションによってもセンス RNA の減少を認めるという報告もある。これらのことから生体内におけるアンチセンス RNA による遺伝子発現抑制機序は、センス RNA がアンチセンス RNA と複合体を形成することにより消化されてしまうためであると考えられた。

本研究はアンチセンス RNA により生体内において遺伝子の発現調節が出来ることを明らかにしたものであり、価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。