

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18387

研究課題名(和文) 卵母細胞成熟における必須遺伝子スクリーニング法の開発と応用

研究課題名(英文) The screening for the genes to function during egg maturation

研究代表者

森 雅志 (Mori, Masashi)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00747941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：女性は年齢の増加に伴い卵母細胞の成熟過程で異常が出やすいことから、本研究ではこの過程を分子的に解明することを目指した。当初計画していたノックダウンによるスクリーニングは他の研究室から発表されてしまい断念したが、ノックアウトマウスの作製に戦略変更して解析を行った。卵母細胞に強く発現する遺伝子を候補として9遺伝子に対するノックアウトマウスを作成し、そのうち1遺伝子において不妊である可能性がでてきた。

研究成果の概要(英文)：Since aged oocytes often have abnormality in its maturation, we aimed to understand oocyte maturation. At the beginning, we planned to screen the genes to function during oocyte maturation by knock down with siRNA. However a similar paper was published by other group, and we changed our strategy to screen by knock out mice. We produced KO mice for 9 genes, and found that 1 KO line can be infertile.

研究分野：生殖

キーワード：生殖 卵母細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在日本では10組に1組は不妊カップルだと言われており、国内で不妊治療を受けている患者は約47万人と推計されている(日本産婦人科学会より)。不妊治療後に子供を授かるカップルが増加する一方で、治療後も子供を授からないカップルは少なくない。不妊症の約半分は女性側に起因し、その多くの場合で加齢に伴う卵子の質の低下が原因とされる(Holt JE et al., 2013)。しかしながら卵子の質とは何かを分子的に議論する基礎データがまだまだ足りておらず、残念ながら現在のところ有用な検査法や予防法は存在していない。

## 2. 研究の目的

年齢が上がるにつれて卵母細胞の成熟過程で異常が出ることが報告されている。研究データが多く蓄積されている体細胞とは違い、卵母細胞で機能する分子についてはまだまだ解明されていないことが残されている。そこで本研究では卵子成熟機構に機能する新規分子の同定を目指して、スクリーニングの系作製を目指した。

## 3. 研究の方法

当初の計画ではsiRNAを用いたノックダウン法により候補遺伝子をスクリーニングする予定であった。しかしながら平成27年度の半ばにほかの研究室から卵母細胞における網羅的なノックダウンの研究成果が発表された(pfender S. et al., Nature 2015)。この論文では800以上もの遺伝子のノックダウンを行っており、表現型が見られる遺伝子数個について解析結果を報告していた。800の遺伝子をノックダウンしたにも関わらず数個しか表現型が見られないという結果であり、このことからノックダウン法では十分に標的遺伝子の発現を抑制できていないことが考えられた。我々はこの結果を考慮して、ノックダウン法は卵子の必須遺伝子スクリーニングに向いていないと結論した。ノックアウトマウスを作製すれば、確実にタンパク質の発現を抑制できる。そこで急遽戦略を変更し、ノックアウトマウスの作製によって卵子成熟過程に必須な遺伝子をスクリーニングすることにした。近年CRISPR/Cas法などのゲノム編集技術を用いて短期間でのノックアウトマウス作製が可能となってきた(Mashiko D et al., 2014)。所属する伊川研究室ではCRISPR/Cas法の評価系および作製系が確立されており、より効率的にKOマウスの作製が可能であった。このような研究環境が戦略変更を後押しした。

## 4. 研究成果

(1) マウス卵母細胞の質量分析結果から

タンパク質の発現が確かな約4000遺伝子が同定されている(Wang et al., 2010)。この遺伝子の転写発現組織をUnigene ESTprofile (NCBI)を用いて一つ一つ調べ、マウス卵母細胞および未受精卵に限定してmRNAが発現している248個の遺伝子をピックアップした。すでにノックアウトマウス解析が行われている遺伝子が36個存在し(不妊の表現型は12個、不育の表現型は4個)、未解析遺伝子は212個であった。この中からヒトで相同遺伝子の存在するもの、受精後にタンパク質量が減少するもの、膜局在ドメインを有するもの、mRNA結合ドメインを有するもの等を考慮してノックアウトする候補遺伝子を選別した。

(2) CRISPR/Cas法を用いて候補遺伝子のノックアウトマウス作製を開始した。遺伝子の各アイソフォームに共通なエクソンの配列からgRNAを複数デザインし、それらのDNA切断活性を培養細胞も用いた系で測定した。培養細胞内で高い切断活性を示したgRNAをマウス受精卵の前核に注射し、その胚を代理母に移植した。得られたF0マウスのゲノム配列を確認し、遺伝子が改変されたマウスを得た。ゲノム改変マウスと野生型マウスとの交配からF1マウスを作製し、その中からフレームシフト変異を持っているマウスを選別した。これまでに13個の候補遺伝子についてインジェクションを行い、そのうち10個の遺伝子でフレームシフト変異マウスを得ることができた。同じフレームシフト変異を持つヘテロマウス同士を交配させて、F2もしくはF3でホモマウスを作製した。ヘテロマウスが得られた10個の遺伝子の内、1個の遺伝子ではヘテロマウス同士を交配させてもホモマウスが得られず、胎生致死であると結論した。他の9遺伝子については雄と雌両方のホモマウス(KOマウス)を用意し、KOマウス同士を交配させて、子供が生まれるかどうかで妊孕性を検討した。

(3) 解析を行った9個の遺伝子の内、8遺伝子はKOマウスが野生型と同様の妊孕性を示した。残りの1遺伝子は子供が生まれずに不妊であるという結果となった。この遺伝子の雄のKOマウスを野生型の雌マウスと交配させると子供が得られるため、KO雌マウスに異常があることが示された。

野生型と同様の妊孕性を示したノックアウトマウスの一部に関しては、KOマウスが不妊にならなかったというネガティブデータとして論文内で発表した(雑誌論文)。

(4) 雌の不妊の表現型が見られたKOマウスは不妊以外にも体の不具合が見られる。明らかに足付近に異常があり、足を引きずっている。このことから不妊の表現型が体の不具合によるものか、卵子成熟過程での異常によるものかは今後の解析が必要である。KOマウス

スの雌が用意でき次第卵子を回収し、その成熟過程に異常があるかを検討する予定である。その際には卵子の体積、受精能、初期発生能を評価して異常の有無を判断したい。

雄マウスは妊孕性があったと上記したが、こちらは見た目からは明らかな体の不調は見られない。ただ念のため、雄 KO マウスも長期にわたり観察し体の不具合等見られるかを検討したい。

(5) 候補遺伝子の数を増やし、現在も卵母細胞特異的に発現している遺伝子のノックアウトマウス作製を続けている。不妊の表現型が見られるものを同定し、その遺伝子の機能を解析していく予定である。

#### <引用文献>

Holt JE, Lane SI, Jones KT. "The control of meiotic maturation in mammalian oocytes." *Current topics in Developmental Biology*. 102, p207-226 (2013)

Pfender S, Kuznetsov V, Pasternak M, Tischer T, Santhanam B, Schuh M. "Live imaging RNAi screen reveals genes essential for meiosis in mammalian oocytes." *Nature*. 524, p239-242 (2015)

Mashiko D, Young SA, Muto M, Kato H, Nozawa K, Ogawa M, Noda T, Kim YJ, Satouh Y, Fujihara Y, Ikawa M. "Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes." *Development, Growth and Differentiation*. 56, p122-129 (2014)

Wang S1, Kou Z, Jing Z, Zhang Y, Guo X, Dong M, Wilmut I, Gao S. "Proteome of mouse oocytes at different developmental stages." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107, p17639-17644 (2010)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計 1件)

Miyata H, Castaneda JM, Fujihara Y, Yu Z, Archambeault DR, Isotani A, Kiyozumi D, Kriseman ML, Mashiko D, Matsumura T, Matzuk RM, Mori M, Noda T, Oji A, Okabe M, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Ramirez-Solis R, Satouh Y, Zhang Q, Ikawa M, Matzuk MM. "Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in

mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113, p7704-7710 (2016)

#### [学会発表](計 1件)

Mori M, Somogyi K, Kondo H, Machado P, Lénárt P. "Actin is required for germinal vesicle breakdown in starfish oocyte" Oocyte maturation and fertilization IV, 2015年6月15-18日 浅虫

#### [図書](計 0件)

#### [産業財産権]

#### 出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

#### 取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

#### [その他]

ホームページ等  
大阪大学微生物病研究所伊川研究室 HP  
<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
森 雅志 (Mori Masashi)

大阪大学微生物病研究所遺伝子機能解析分野伊川研究室 助教

研究者番号: 00747941

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者

伊川 正人 (Ikawa Masahito)

大阪大学微生物病研究所伊川研究室・教授

Ferheen Abbasi (Ferheen Abbasi)

大阪大学微生物病研究所伊川研究室・学生