

令和元年9月5日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21664

研究課題名(和文) マウス胎生期卵巣分化に関わる転写因子の機能同定と転写ネットワークの構築

研究課題名(英文) Identification of transcription factors related to mouse ovarian differentiation and construction of transcription network

研究代表者

加藤 朋子 (KATO, Tomoko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・研究員

研究者番号：10638802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの胎仔期の卵巣分化過程において必須の遺伝子はほとんど未知であり、また卵巣発生過程における構造変化に乏しいことから、その分子メカニズムについては不明な点が多い。そこで、本研究では卵巣分化候補の18遺伝子を対象にした *in situ* hybridization と免疫染色により、細胞種の同定を試みた。更に、CRISPR/Cas9システムを用いて18遺伝子のノックアウトマウスを作製し、その機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の生殖腺分化過程において、精巣分化過程における分子メカニズムは徐々に明らかになってきているが、卵巣分化過程における分子メカニズムは未だ不明な点が多い。しかし、近年、卵巣分化を引き起こす重要な遺伝子の存在が指摘されてきており、これらの遺伝子は卵巣・卵子の質の低下、及び妊孕性の低下に大きく関わる可能性がある。これらの問題は、女性の社会進出と共に問題視されている高齢出産の壁を解決する糸口となり得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The key genes involved in fetal mouse ovarian development and molecular mechanism through ovarian differentiation are almost unknown because the ovarian structure is poor during these stages. In this study, we tested to identify the cell type of 18 candidate genes involved in ovarian differentiation by using *in situ* hybridization and immunostaining. In addition, we generated 18 ovarian genes knock out mice to clarify their functions.

研究分野：性分化

キーワード：性分化 卵巣 ノックアウトマウス 機能解析 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の生殖腺分化過程において、1990年初頭に雄の性決定遺伝子 *Sry* が発見されて以来、*Sox9* を始めとする下流に位置する遺伝子がいくつか明らかになってきており、特に精巢分化の分子カスケードに関する研究は加速してきている。一方で、卵巣分化に関する研究は形態学的変化に乏しいことも相まって、卵巣分化過程で発現している遺伝子、及びその分子カスケードについては今日までほとんど未解明のままであった。これまで性決定遺伝子 *Sry* が発現すると雄へと分化し、発現しないと雌へと分化すると考えられていたが、最近では雌においても性決定を促すマスター遺伝子が存在し、またその下流で積極的に雌化を促す分子カスケードが存在すると考えられている。代表者は、所属研究室が有する、マウスゲノムに存在するすべての転写因子・転写コファクター約 1520 遺伝子を対象にした胎生 13.5 日胚の生殖腺における whole mount in situ hybridization データベースを精査し、このうち卵巣で強く発現する遺伝子を 18 遺伝子抽出した。いずれも新規に発見された遺伝子であり、卵巣分化の転写カスケードに関わっている可能性が期待される。

## 2. 研究の目的

所属研究室が有するデータベースより抽出された 18 遺伝子について、マウス胎生 13.5 日胚の卵巣切片を用いて in situ hybridization/ 蛍光免疫染色を行い、顆粒膜細胞・莢膜細胞・生殖細胞の何れに発現しているかを確認する。さらに、CRISPR/Cas9 システムを用いて各 18 遺伝子のノックアウトマウスを作製し、胎生期～性成熟期において卵巣の機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス胎生 13.5 日胚の卵巣における in situ hybridization/ 免疫染色

ICR マウス胎生 13.5 日胚の卵巣と中腎を採取し、常法により固定処理、薄切切片の作製を行う。顆粒膜細胞のマーカースとして *Foxl2*、莢膜細胞のマーカースとして *3β-hsd*、生殖細胞のマーカースとして *Oct4* を用い、蛍光免疫染色を行う。Section in situ hybridization については、各 18 遺伝子の全長配列をテンプレートとし、Digoxigenin (DIG)-UTP を含むリボヌクレオチド混合物の存在下で in vitro 転写反応を行い、完全長の DIG 標識 RNA プローブを合成する。標的部位に RNA プローブが結合した後、HRP 標識抗 DIG 抗体を用いて抗原抗体反応を行い、さらにチラミド反応液を加えて標識を増感させる。本研究では、上記の方法で蛍光 section in situ hybridization を行った後、同じ組織切片を用いて蛍光免疫染色を行い、多重染色を試みる。

### (2) 卵巣分化候補 18 遺伝子のノックアウトマウスの作製と機能解析

卵巣分化候補 18 遺伝子について、CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトマウスの作製を行う。各遺伝子の開始コドン付近の配列を破壊するように gRNA を設計・合成し、hCas9 と共に受精卵へマイクロインジェクションを行う。そして、翌日に偽妊娠 ICR マウスの卵管内へ移植する。出生後、産仔の tail tips からゲノムを抽出し、編集した周辺配列の DNA 増幅及びサンガーシーケンシングにより遺伝子型を決定し、F0 世代として樹立する。ノックアウト個体のうち 3 系統ずつ次世代に用いることとし、この F0 世代を野生型 C57BL/6 マウスと交配させて F1 世代 (ヘテロマウス) を得る。さらに、F1 世代のヘテロマウスの雌雄同士を交配させて F2 世代を得る。そのうち両アレルで配列が欠損しているホモマウスをノックアウトマウスとして機能解析を行う。機能解析は性成熟を迎える 8 週齢に内外生

生殖器の観察を行い、性転換の有無を調べる。更に、卵巢を採取して組織切片を作製し、HE染色により卵巢形成に異常が見られるか否かを観察する。また、18 遺伝子のうち、Irx3 と Irx5、また Rhox2a と Rhox6 は互いがリダンダントに機能する可能性があると考えられるため、同一染色体上で 2 つの遺伝子を同時にノックアウトさせたダブルノックアウトマウスを作製し、組織学的手法を用いて表現型の解析を行う。

#### 4 . 研究成果

##### (1) マウス胎生 13.5 日胚の卵巢における in situ hybridization/ 免疫染色

顆粒膜細胞のマーカーは Foxl2、莢膜細胞のマーカーは 3β-hsd、生殖細胞のマーカーは Oct4 を用いて、蛍光免疫染色の条件を定めた。次に各 18 遺伝子の DIG 標識 RNA プロブを合成し、蛍光 section in situ hybridization を試みた。対象遺伝子の発現量が低いことは当初から想定していたので、チラミド反応液による標識の増感を試みたが、各細胞種の発現陽性細胞を検出することはできなかった。組織全体を対象にした whole-mount in situ hybridization では卵巢全体に強い発現が認められていたが、今回試みた組織の in situ hybridization では、発現量の低い遺伝子の発現検出が困難であることを示唆している。

##### (2) 卵巢分化候補 18 遺伝子のノックアウトマウスの作製と機能解析

F0 世代で、胎生致死の為に産まれないマウスは 8 系統 (8 遺伝子)、F2 世代の解析の結果、表現型が野生型と同様のマウスが 10 系統 (10 遺伝子) であった。野生型と同様の表現型を呈したノックアウトマウスのうち、Irx3 と Irx5、Rhox2a と Rhox6 は機能が類似しており、互いがリダンダントに機能する可能性があるため、同一染色体で 2 つの遺伝子を同時に欠損させたダブルノックアウトマウスの作出を試みた。Irx3/Irx5 については 3 回のマイクロインジェクションを施し、27 頭中 6 頭、24 頭 7 頭、21 頭中 3 頭がダブルノックアウトマウスであることを確認した(Hara and Kato et al., *J Reprod. and Dev.* 2016)。F0 世代のノックアウトマウスについて表現型解析を行ったところ、いずれも野生型マウスと比べて体長が小さく、中には多指症が見られる個体も存在した。得られたノックアウトマウスはいずれも体長が小さいため、これらのノックアウトマウスを次世代の交配に用いて妊孕性を確認できなかったが、卵巢の組織学的解析を正常な卵巢形成が進行していたため、卵巢形成には影響を及ぼさないと考えられる。一方で、Rhox2a と Rhox6 は配列が非常に類似しており、gRNA も類似の配列箇所のみ設計可能であった。このため、PCR、シーケンズ解析の段階で 2 遺伝子を区別することが不可能であったため、止む無く実験を中断することとした。なお、胎生致死の為に産まれないマウスに関しては、組織特異的プロモーターを用いてコンディショナルノックアウトマウスを作出することによって成獣期での解析が可能になると考えているが、現段階で発現細胞種の特定が出来ないために作出が不可能であったため、実験計画を中断した。

##### (3) DNA マイクロアレイデータより抽出した新規卵巢分化候補遺伝子の同定

C57BL6 系統の E13.5 日胚のマウスより採取した生殖腺から抽出した mRNA について逆転写酵素を用いて cDNA に変換し、マイクロアレイを用いた DNA 発現解析を行った。その結果、精巣に比べて卵巢で高い発現挙動を示す遺伝子がいくつか得られ、これらを新規卵巢分化候補遺伝子とした。次に、これらの遺伝子を対象に qPCR による mRNA の発現定量解析、ICRE13.5 日胚を用いた whole-mount in situ hybridization、さらに種間の保存性

を確認するために、ニワトリ胚を用いた whole-mount in situ hybridization を行って mRNA の発現を検討した。その結果、卵巢で優位に発現する 3 遺伝子を絞り込み、新規卵巢分化候補遺伝子とした。

#### (4) 新規卵巢候補遺伝子のノックアウトマウスの作出と機能解析

上記 3 遺伝子について、CRISPR/Cas9 システムを用いて、(2)と同様にノックアウトマウスを作出した。その結果、すべての遺伝子において、F0 世代を作出することができた。そこで、F2 世代の成獣期において表現型解析を行ったが、野生型と同様の表現型を呈した。このことは、これらの遺伝子は胎生初期の卵巢形成には影響を与えないか、別の因子によって機能が補完されている可能性を示唆している。

本研究では、胎生期から卵巢分化に大きく影響を与える因子の存在を明らかにすることはできなかった。しかし、胎生致死になった遺伝子の中には卵巢分化に大きな影響を与えている遺伝子が含まれている可能性が含まれているため、今後コンディショナルノックアウトマウスを作出して詳細に解析を進める必要がある。そのためには発現細胞種の同定が急務であるが、特に蛍光標識で感度の高い in situ hybridization 法が確立されていないことが大きな課題であると考えている。さらに、性成熟期を超えての卵巢の機能については、遺伝子発現の影響にとどまることなく、性ホルモンなどの 2 次的影響を強く受けて機能が補完されることも考えられる。このことから、成獣期での解析については経時変化を丁寧に観察していく必要があると考えている。

#### <引用文献>

\*Hara S, \*Kato T, Goto Y, Kubota S, Tamano M, Terao M, Takada S. Microinjection-based generation of mutant mice with a double mutation and a 0.5 Mb deletion in their genome by the CRISPR/Cas9 system. *Journal of Reproduction and Development* 査読有 **62**(5):531-536 (2016)

\*equally contributing author

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Ogawa Y, Terao M, Hara S, Tamano M, Okayasu H, Kato T, Takada S. Mapping of a responsible region for sex reversal upstream of Sox9 by production of mice with serial deletion in a genomic locus. *Scientific Reports* 査読有 **8**(1):17514 (2018)
2. Tsuji-Hosokawa A, Kashimada K, Kato T, Ogawa Y, Nomura R, Takasawa K, Lavery R, Coschiera A, Schiessinger D, Harley V, Takada S and Morio T. Peptidyl arginine deiminase 2 (*Padi2*) is expressed in Sertoli cells in a specific manner and regulated by SOX9 during testicular development. *Scientific Reports* 査読有 **8**(1):13263 (2018)
3. \*Saito T, \*Hara S, Kato T, Tamano M, Muramatsu A, Asahara H and Takada S. A tandem repeat array in IG-DMR is essential for imprinting of paternal allele at the *Dkl1/Dio3* domain during embryonic development. *Human Molecular Genetics* 査読有 **27**(18):3283-3292 (2018) \*equally contributing author
4. Kato-Inui T, Takahashi G, Hsu S, Miyaoka Y. Clustered regularly interspaced short palindromic

- repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 with improved proof-reading enhances homology-directed repair. *Nucleic Acids Research*. 査読有 **46**(9):4677-4688 (2018)
5. \*Kato T, \*Hara S, Goto Y, Ogawa Y, Okayasu H, Kubota S, Tamano M, Terao M, Takada S. Creation of mutant mice with megabase-sized deletions containing custom-designed breakpoints by means of the CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 査読有 **7**:59 (2017) \*equally contributing author
  6. Inui M, Tamano M, Kato T, Takada S. CRISPR/Cas9-mediated simultaneous knockout of Dmrt1 and Dmrt3 does not recapitulate the 46,XY gonadal dysgenesis observed in 9p24.3 deletion patients. *Biochemistry and Biophysics Reports* 査読有 **9**:238-244 (2017)
  7. Kato T and Takada S. In vivo and in vitro disease modeling with CRISPR/Cas9. *Briefings in Functional Genomics* 査読有 **16**(1):13-24 (2017)
  8. \*Hara S, \*Kato T, Goto Y, Kubota S, Tamano M, Terao M, Takada S. Microinjection-based generation of mutant mice with a double mutation and a 0.5 Mb deletion in their genome by the CRISPR/Cas9 system. *Journal of Reproduction and Development* 査読有 **62**(5):531-536 (2016) \*equally contributing author
  9. Fujinaga H, Fujinaga H, Watanabe N, Kato T, Tamano M, Terao M, Takada S, Ito Y, Umezawa A. Cord Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cell Function is Disrupted in Congenital Diaphragmatic Hernia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 査読有 **310**(11):L1143-L1154 (2016)
  10. Terao M, Tamano M, Hara S, Kato T, Kinoshita M, Takada S. Utilization of the CRISPR/Cas9 system for the efficient production of mutant mice using crRNA/tracrRNA with Cas9 nickase and FokI-dCas9. *Experimental Animals* 査読有 **65**(3):275-283 (2016)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Tomoko Kato, Gou Takahashi, Szuyin Hsu, Yuichiro Miyaoka  
Genome editing via Cas9 RNP improves the HDR/NHEJ ratio. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (Genome Engineering: The CRISPR-Cas Revolution) 2018 年
2. 加藤朋子、高橋剛、許絲茵、宮岡佑一郎  
Cas9 リボ核タンパク質(RNP)を介したゲノム編集は HDR/NHEJ 比を亢進する (日本ゲノム編集学会) 2018 年
3. 加藤朋子、高橋剛、許絲茵、宮岡佑一郎  
Cas9 と DNA の結合力が HDR と NHEJ の活性を規定する (生命科学系学会合同年次大会) 2017 年