

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590333

研究課題名（和文） 卵子に特異的に発現する新規 maternal effect 遺伝子の解析

研究課題名（英文） Analysis of novel maternal effect gene, *Ces5*

研究代表者

田代 文（TASHIRO FUMI）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40136213

研究成果の概要：

ES 細胞の分化や未分化状態に関与する遺伝子は、生体における発生・分化過程の理解にも有用と考えられ、未分化 ES 細胞に特異的に発現する遺伝子を単離し *Ces5* と名付けた。作製したノックアウトマウスの雌の不妊を認め、新規な maternal effect 遺伝子と考えられた。電子顕微鏡を用いた解析結果より、*Ces5* は卵の細胞質内の繊維状構造物の構築に関与し、構造体の成分あるいは構築に必須の蛋白であり、初期胚の発生に重要な役割を持つことが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード： 発生・分化、遺伝子、ノックアウト

1. 研究開始当初の背景

ヒトやマウスの胚盤胞より単離された胚性幹 (ES) 細胞は、様々な細胞に分化する多分化能を有するのみならず、未分化状態のまま分裂増殖する高い自己複製能も保持している。その特異な性質から、特定の系列の細胞へと分化誘導し再生医療への利用を検討する研究や、リプログラミングとの関連を含め細胞の未分化状態の解明を目指す研究においても注目されている。ES 細胞の分化あるいは未分化状態に関与する様々な遺伝子の動態は、初期胚が発生・分化してゆく過程を同一ではなくとも反映しているものと考えられ、これらの遺伝子について解析することは、生体における発生・分化過程を理解する上で有用な情報をもたらすものと期待される。これまでに我々は、ES 細胞の分化誘導における GATA 遺伝子の役割についての検討や、ES 細胞からインスリン産生細胞への分化誘導における pdx-1 遺伝子の重要性を報告している (Fujikura et al., Genes & Dev. 16: 784, 2002, Miyazaki et al., Diabetes 53: 1030, 2004)。他のグループからの報告も数多くなされ、発現量や時期など遺伝子間の関係について少しずつ明らかにされてきている。しかし、未分化細胞から多様に特化した細胞へ分化してゆく過程は極めて複雑であり、多数の遺伝子が連携しつつ進行していくと考えられる。従って、細胞の特定の状態における発現遺伝子の動態を網羅的に解析する方法の必要性が考えられた。一方、日本を含め複

数の国の研究機関による遺伝子に関するさまざまなデータを集積したデータベースが構築され、研究者はインターネットを介して膨大なデータを利用可能となっている。このような状況の中、Mitsui らがデータベースを利用した *in silico* スクリーニングを用いて単離、同定した遺伝子 Nanog は、ES 細胞の未分化状態の維持に深く関与するのみならず、ノックアウトマウスの解析より、初期胚発生の極めて初期に重要な役割を持つことが報告され (Cell 30: 631, 2003)、データベースを利用した遺伝子検索の実効性が示された。

そこで我々は、これらの遺伝子データを解析するための独自の解析プログラムを開発し、ES 細胞に特異的に発現する遺伝子のスクリーニングを行い、発生・分化に関与する遺伝子の探索を試みた。

ES 細胞に特異的に発現する遺伝子のスクリーニングの結果、選別されてきた遺伝子の内容は既知遺伝子以外に多くの新規遺伝子が含まれていた。そのように選別された新規遺伝子の一つである CES5 は、ES 細胞の分化に伴い発現が減少し、生体においては雌の生殖細胞でのみ発現が見られた。そこで CES5 遺伝子の機能を明らかにし、この遺伝子の発生・分化への関与の有無を解析するために、ノックアウト (K.O.) ES 細胞の単離を試みた。得られたヘテロ K.O. ES 細胞より作製したホモ K.O. ES 細胞について細胞の性状を検討した結果、発現遺伝子や細胞の形態などに顕著な変化は認められなかった。

次に生体における CES5 遺伝子欠損の影響を検討するために、K. O. ES 細胞を用いてキメラマウスを作製した。キメラマウスを交配し得たヘテロ K. O. マウス同士を交配した結果、メンデルの法則に沿った割合で雌雄のホモ K. O. マウスが生まれ、成獣まで成長することを確認した。従って、CES5 遺伝子はマウスの発生・成長には影響しないことが示された。生殖系列細胞への影響を検討する目的で、雌雄のホモ K. O. マウスを野生型マウスと交配したところ、雄のホモ K. O. マウスは野生型と同様に子孫が得られ、著名な異常は認められなかった。一方、雌の K. O. マウスからは子孫が得られず、何らかの生殖系列における異常が考えられた。このようにして ES 細胞の未分化状態に関連して選別されてきた遺伝子が、生体の雌性生殖細胞に何らかの影響を及ぼしていることが推測され、この遺伝子の機能を明らかにすることにより、生殖細胞の発生・分化の過程を理解する上で有用な知見が得られることが期待された。

野生型雄マウスとの交配が成立したホモ K. O. マウスにおいて、不妊を呈したことから、*Ces5* は maternal effect 遺伝子と考えられた。maternal effect 遺伝子の重要性を示す例として、ヒトにおいて正常な卵母細胞の蛋白質を不妊の患者の卵子に注入することによる妊娠の成功が報告されている。しかし、その中で効果のあったファクターの同定はなされていない。maternal effect 遺伝子として知られる MATER は、マウスの *Mater* 遺伝子の情報を基にヒトの遺伝子が

同定され、自己免疫による不妊との関連が予想された。このように、maternal effect 遺伝子の初期胚における役割と重要性はまだ解明されていないことが多く、これらの遺伝子に関する情報を蓄積していくことは、将来ヒトの不妊治療の方法の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究においては、初期胚の発生の極めて初期段階で重要な役割を担うことが想定される maternal effect 遺伝子 CES5 の機能を明らかにし、ヒトの不妊治療に貢献できるような知見を得ることを目的とする。最初の卵割への影響やその障害のメカニズムを明らかにし、さらに他のファクターとの関連や、卵子内での動態を解析する。

3. 研究の方法

- 1) 組織学的解析を行うため、卵巣および回収した卵について、凍結切片やパラフィン切片を作製し、免疫組織化学、HE 染色を行った。
- 2) 回収した未受精卵を野生型の雄の精子を用いて体外受精し、初期発生の検討を行った。卵の数、顕微鏡による観察、発生の進行及びその効率を観察した。
- 3) 電子顕微鏡による、微細な構造の検討を行った。さらに、抗体を用いて免疫電子顕微鏡の解析を行い、*Ces5* 蛋白質と細胞内の構造との関連を観察した。

4. 研究成果

- 1) 雌のホモ K. O. マウスの不妊の原因を明らかにするため、まず卵巣の組織学的解析、

交配行動や排卵などの状態、さらに卵子や初期胚の性状などを検討した。ホモ K. O. マウスの卵巣には、各成熟段階の卵胞が見られ黄体も確認されたことから排卵も起きていると考えられ、卵巣における顕著な異常は認められなかった。また、Ces5 蛋白質の局在を免疫染色にて検討した結果、野生型マウスにおいては卵子に特異的に存在し、ホモ K. O. マウスでは完全に蛋白質が消失していることが確認された(図 1)。

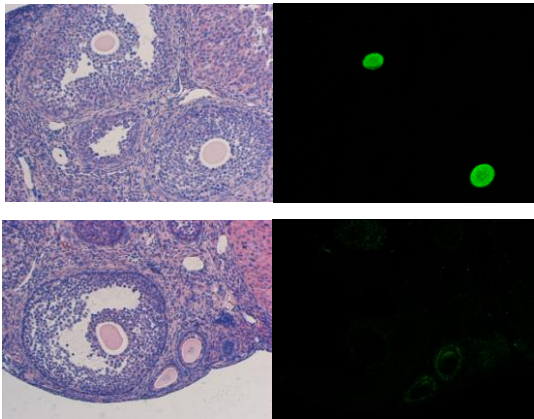


図 1. 卵巣組織 hetero (上段)、homo (下段) の HE 染色 (左) と免疫組織化学 (右)

2) 次に、野生型雄マウスとの交配が成立したホモ K. O. マウスにおいても、野生型と同程度の個数の卵が回収され、交配や排卵にも異常は確認されなかった。しかし回収された受精卵を培養し発生の進行を観察したところ、正常な 2 細胞期胚は殆ど観察されず、卵割を含む受精後の極めて初期に何らかの異常が起きていることが示唆された。

3) 受精が正常に起こっているか、DNA 結合性蛍光色素である DAPI を用いて未受精卵および受精卵を染色した。その結果、野生型マウスと同様にホモ K. O. マウスの未受精卵では、極体を除くと雌性前核 1 個が染色され、また受精卵は極体以外に 2 個の核が染色され、通常の受精が起きていることが確認された。

4) ホモ K. O. 雌由来の胚では受精後の発生が遅延し、免疫染色により Ces5 蛋白質は卵の細胞質にやや不均一に存在し、蛋白質の偏りや細胞内構造物との関連などが考えられた。そこで、電子顕微鏡を用いた微細構造の検討を行った。卵巣内の卵胞および卵母細胞に顕著な異常はみられなかったが、より微細な構造を検討すると、細胞質内の繊維状構造物がホモ K. O. の卵母細胞で完全に消失していた。また、排卵された未受精卵を回収し同様な観察をおこなったところ、卵胞内と同様に細胞質内の繊維状構造物がホモ K. O. の卵子でも消失していた。そこで、Ces5 蛋白質の細胞内局在を免疫電子顕微鏡により検討した。ヘテロ K. O. の卵で観察された繊維状構造物に金粒子の局在が認められ、この構造物と Ces5 の関連が示された。

以上の結果より、Ces5 は卵の細胞質内に観察される繊維状構造物の構築に関与し、構造体の成分、あるいは構築に必須の蛋白であり、初期胚の発生に重要な役割を持つことが示唆された。

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 2 件)

- ① Toyoda, S., Miyazaki, T., Miyazaki, S., Yoshimura, T., Yamamoto, M., Tashiro, F., Yamato, Y. & Miyazaki, J.: Sohlh2 affects differentiation of KIT positive oocytes and spermatogonia. Dev. Biol. 325 : 238-248, 2009. <査読有>
- ② Yoshimura, T., Miyazaki, T., Toyoda, S., Miyazaki, S., Tashiro, F., Yamato, E. & Miyazaki, J.: Gene expression pattern of Cue110: a member of the uncharacterized UPF0224 gene family preferentially expressed in germ cells. Gene Expression Patterns 8: 27-35, 2007. <査読有>

[学会発表] (計 6 件)

- ① 田代 文、新規 maternal effect 遺伝子 Ces5 のノックアウトマウスの解析、日本分子生物学会、2008年12月11日、神戸市
- ② 豊田 秀一、マウス精子形成・卵形成に関与する bHLH型転写因子 CUE318 の機能解析、日本分子生物学会、2008年12月11日、神戸市
- ③ 能村 卓慈、精巣におけるレトロトランスポゾン発現抑制に関与するマウス Cue110 遺伝子の機能解析、日本分子生物学会、2008年12月11日、神戸市
- ④ 田代 文、マウスの ES 細胞および卵子で特異的に発現する新規 maternal effect

遺伝子 Ces5 の解析、日本分子生物学会、2007年12月12日、横浜市

- ⑤ 豊田 秀一、精子形成・卵形成に関与する bHLH型遺伝子 Cue318 の機能解析、日本分子生物学会、2007年12月12日、横浜市
- ⑥ 能村 卓慈、精子形成異常を示す Cue110 ノックアウトマウスの表現型解析、2007年12月12日、横浜市

6. 研究組織

(1)研究代表者

田代 文 (TASHIRO FUMI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 40136213

(2)連携研究者

倭 英司 (YAMATO EIJI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 20273667