

平成21年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号： 19770004

研究課題名（和文） 胚盤胞における雌雄差と機能性 small RNA の分子生物学的解析

研究課題名（英文） Analysis of functional small RNAs in male and female blastocysts

研究代表者

小林 慎 (KOBAYASHI SHIN)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任講師

研究者番号：10397664

研究成果の概要：

哺乳類の遺伝学的な性（雄はXY，雌はXX）は受精時に決まり、ついで*Sry*の発現が引き金となって生殖腺の性が決まり、生殖腺からの性ホルモンが全身に作用して雌雄に様々なちがいを引き起こすといわれている。しかし着床前に雄は雌より早く成長するという報告があり、この時期から雌雄が性分化をしている可能性が高い。そこで「雌雄の発生がいつから異なるのか？」というテーマに取り組むため発生初期の雌雄の胚を比較してきた。我々のこれまでの研究では、DNAマイクロアレイの解析により従来考えられていたより早い胚盤胞期から既に雌雄の遺伝子発現が異なっていることを明らかにしている。一方、近年、small RNAと呼ばれる低分子のRNAが見つかってきており、これらは哺乳類の発生において重要な機能を持ち、正常な個体発生に必須の分子であることがわかってきた。我々は雌雄の発生を分子生物学的に比べるには既知遺伝子だけではなく、small RNAの比較解析も必須であると考えた。そこで雌雄間で発現の異なるsmall RNA分子を探索を行うために、まず胚盤胞におけるsmall RNA libraryの作製を行なうことにした。胚盤胞は微量のサンプルであるため、PCRによるサンプルの増幅などの工夫を凝らすことにより、雌雄の胚盤胞各1000個からオリジナルのクローン数が多い良質のライブラリーを作製することに成功した。次に、このライブラリーについて大規模シーケンスを行い、雌雄それぞれ30万以上のsmall RNAの配列決定に成功している。現在、両者の配列を比較し雌雄間で発現の差を示す候補small RNAを複数同定している。これにより着床前の雌雄胚で発現に差があるsmall RNAのデータという着床前における雌雄の発生を理解する上で非常に貴重な情報が得られたと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：(1) small RNA (2) 性分化

1. 研究開始当初の背景

一般的な考えでは、受精時に遺伝的な性が決まるが、個体の性分化は生殖巣が分化することにより始まると考えられている。しかし、生殖巣の分化以前に雌雄の発生に性差は存在しないのであろうか？ 実際、着床前の雄胚は、雌胚よりも早く成長すると言う報告があり、この時期での雌雄の違いを示唆している。そこで、我々は哺乳類において生殖腺の性決定以前に雄と雌にすでに差異が存在するかどうかを、分子生物学的に検討することにした。

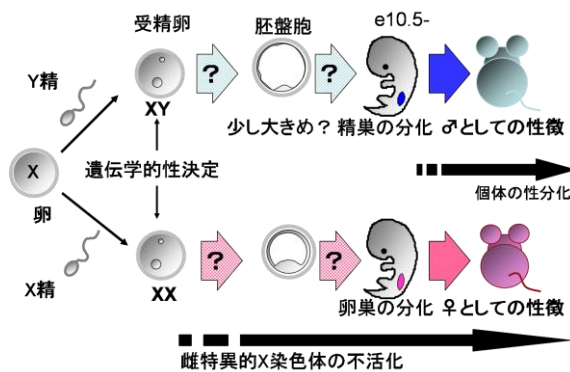


図1. 雌雄はいつから異なり始めるのか？

平成 17, 18 年度の若手研究 B の研究で、GFP トランスジェニックマウス (図 2) を用いた雌雄判別方法を使い着床前の段階で雌雄の胚盤胞の遺伝子発現を比べた。解析には既知全遺伝子が解析できる DNA マイクロアレイを用いた結果、胚盤胞で既に雌雄が異なり、約 600 もの遺伝子に差があることを示した。更にそれらの中から雌で特異的に発現する 2 遺伝子 (*Xist*, *Rhox5*) 雄で特異的に発現する遺伝子 (*Dby*, *Eif2s3y*) を同定し(表参照)、その発現を詳細に解析したところ X 染色体上のインプリント遺伝子 *Rhox5* 遺伝子を発見し報告している (Kobayashi *et al.*, *Curr Biol* (2006))。

表 着床前に雌雄特異的な発現をする遺伝子群

解析対象の遺伝子	雄特異的遺伝子	雌特異的遺伝子	雌雄の発生における機能
既知遺伝子 (タンパクをコード)	<i>Dby</i> , <i>Eif2s3y</i>	<i>Xist</i> , <i>Rhox5</i>	<i>Xist</i> (X染色体不活化) その他は性差に関わる経路なし
Small RNAs (miRNA, piRNA unknown small RNA?)	?	?	?

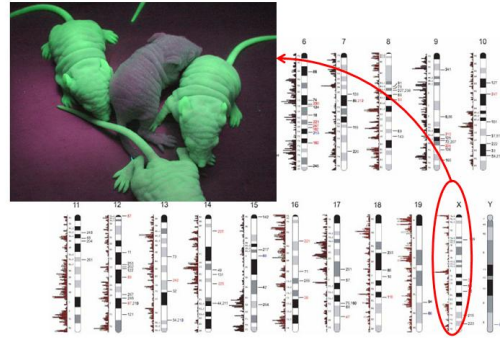


図2 X^{GFP}マウス

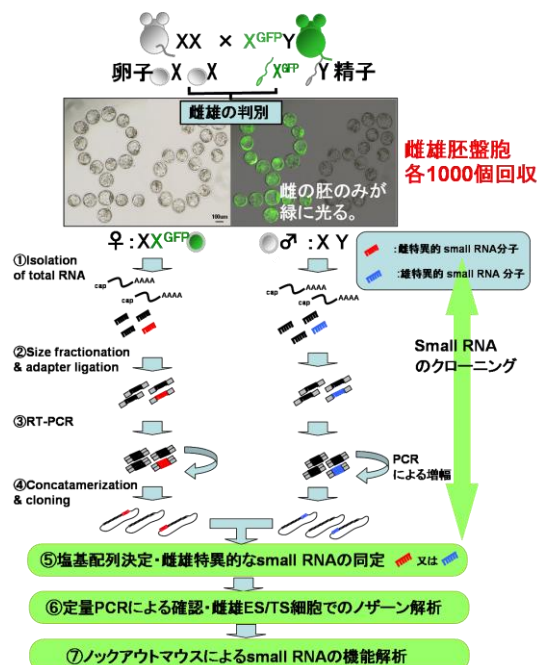
だが着床以前の雌雄の発生を比べる手段として、既知遺伝子の解析できる DNA マイクロアレイは十分であろうか？ 最近の研究により、DNA の屑と考えられてきたイントロンや遺伝子間領域からも、無数の small RNA 分子 (例 microRNA, siRNA, piRNA) が転写され、機能を持った RNA として転写や翻訳を調節していることが分かってきた。例えば、microRNA の生成経路に関わる *Dicer* 遺伝子のノックアウトマウスは着床後すぐに胚性致死となることから、*minco* RNA が初期発生に関与することが指摘されている (Bernstein *et al.* *Nat Genet*, 35, 2003)。また、RNAi 経路に関わり、siRNA と複合体を作って働く *Argonote2* のノックアウトマウスも胚性致死となる (Liu, J *et al.* *Science*, 2004)。一方で成体マウスにおいても small RNA の機能を示唆する報告がある。piRNA と結合する *Argonote* ファミリーの一つである *Piwi* 遺伝子のノックアウトマウスは精子形成不全を起こすことから、piRNA が精子形成に働くことが示唆されている (Deng, W *et al.* *Dev. Cell*, 2, 2002, Kuramochi-Miyagawa, S *et al.* *Development*, 13, 2004)。これらの例が示すように、small RNA は哺乳類においても重要な機能を持ち、正常な個体発生に必須の分子であると考えられる。そこで雌雄の発生を分子生物学的に比べるには既知遺伝子だけではなく、small RNA も含めた解析が是非とも必要であると考えた。しかし哺乳類の初期発生に「どのような種類の small RNA」が「どの位の数転写され機能しているのか？」また「どのような機構で機能しているのか？」などまだ殆ど研究が進んでいない状況である。

2. 研究の目的

本研究はこれまで行ってきた雌雄の発生がいつから異なるのか?というテーマを更に発展させたものである。胚盤胞を材料に、雌雄間で small RNA を体系的にクローニングし、両者を比較することにより、雌雄間で発現の異なる small RNA 分子を探索する。雌雄間で発現の異なる small RNA が同定できれば、その機能をノックアウトマウス、またはノックダウン法を用いて解析する。このように、生殖腺の性分化に先立って起こる性分化のメカニズムを機能性 RNA の役割を通じて解明していきたい。同時に、本研究は哺乳類の個体発生における small RNA の役割を解明する先駆けとなる研究である。

3. 研究の方法

図4上部に示すように X^{GFP} マウスを使うと、着床前に雌雄を判別することができる。 X 染色体上に GFP 発現カセットが挿入された雄マウス (X^{GFPY} マウス) と野生型の雌マウス (XX) を交配させ受精卵を作製すると、GFP が挿入された X^{GFP} を持つ精子が受精した場合、子供は緑色蛍光を発する XX^{GFP} 雌になる。一方、 Y を持つ精子が受精した場合子供には蛍光は観察されない。実際に緑色蛍光は発生のごく初期段階から観察され、確かに光る卵と光らない卵ができた (図4上部写真)。さらに、これらの胚を仮親マウスに移植すると 100% の精度で、光る卵から雌、光らない卵から雄が生まれることが確認されている。



この系を使いクローニングに必要な雌雄合計 2000 個の胚盤胞のサンプルを選別した。この系を使わず、一個一個について雌雄をタイプングしていたのでは到底これほどの数

はこなせない。

4. 研究成果

X^{GFP} 性判別法で選別した雌雄各 1000 個の胚盤胞から図4に示す手順①-⑥に沿って small RNA のクローニング及び解析を行った。クローニング方法は Current Protocol in Molecular Biology (UNIT26.4) 及び、Misk, E.A. et al. Genome Bio. 2004 を参考に行った。

- ① total RNA の抽出
- ② 15-35 塩基の大きさの RNA の回収及びアダプターのライゲーション
- ③ 逆転写、及び PCR による cDNA の増幅。
最近 Misk らのプロトコルで PCR サイクルを増やすことにより細胞 3000 個から small RNA のクローニングに成功した例が学会で報告された (Cold spring harbor Germ cells Meeting 2006)。一方申請者の実験では、雌雄間での small RNAs の比較が目的であるため、作製するライブラリーはオリジナルのクローン数が多くなければならない。そのため、出来る限り出発材料の数を多く準備 (胚盤胞雌雄各 1000 個ずつ準備、細胞数 12 万個に相当) することで、PCR のサイクル数を減らす工夫を凝らし、オリジナルのクローン数の多いライブラリーの作製を行った。
- ④ PCR 産物のライゲーション及びプラスミドベクターへのクローニング
- ⑤ 454 大規模シーケンサーを用いたライブラリーの塩基配列決定
雌雄それぞれ 30 万以上の断片について塩基配列を決定することに成功した。大規模コンピューターを用い雌雄で発現する small RNAs を包括的に比較し、雌または雄で特異的に発現する small RNA 分子の候補を絞り込む作業を進めている。これまでの解析から、雌雄間で発現の差を示す候補 small RNA を複数同定することに成功した。これにより着床前の雌雄胚で発現に差がある small RNA のデータという着床前における雌雄の発生を理解する上で非常に貴重な情報が得られたと考えられる。

- ⑥ 雌雄特異的 small RNAs 候補の定量 PCR による発現確認。既に microRNAs などの発現を定量するプロトコル (Tang F. et al., NAR, 2006) は報告されており、これを参考にプライマーの設計を行っている。幾つ

かの候補については real time PCR により発現の差異が確認できた。一方、その他の small RNAs については、胚盤胞は限られた材料であるため従来通りのノザン解析は不可能である。そのため胚盤胞の2種の組織である内部細胞塊 (Inner cell mass) と栄養外胚葉 (Trophectoderm) から樹立されたES及びTS培養細胞を補足的に使い、ノザン解析を行い small RNA の全長を決定する。ES、TS 細胞 (雌雄合わせて合計 4 種) は共同研究者の阪大岡部勝教授の研究室で樹立に成功し、解析の準備は整った。

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)

[学会発表] (計 1 件)

小林慎 「着床前に雌特異的発現を示す Fat45 ファミリー遺伝子の解析」第31回日本分子生物学会年会/第81回日本生化学会合同大会 H20年12月10日~12月12日 神戸ポートアイランド

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/mtt/mtt.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林慎 (Shin Kobayashi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・MTT
プログラム・特任講師
研究者番号：30089875

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書