

平成 23 年 6 月 5 日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2008~2010

課題番号： 20770185

研究課題名 (和文)

新規ポリコーム群結合タンパク質 *Topors* の XY 体形成過程における作用機序の解明研究課題名 (英文) Analysis of roles for *Topors* protein, a new Polycomb-binding protein, during spermatogenesis

研究代表者

高田 幸 (TAKADA YUKI)

独立行政法人理化学研究所・免疫器官形成研究グループ・基礎科学特別研究員

研究者番号： 40392013

研究成果の概要 (和文)：

生体内における機能を解析することを目的として、*Topors* 遺伝子欠損マウスを作製したところ、雌雄ともに不妊である事がわかった。雄の *Topors* 遺伝子欠損マウスにおいては、精子の運動能が顕著に低下しており、さらに生殖行動にも問題があることがわかった。雌の欠損マウスにおいては、エストロゲンの血中濃度に影響はないものの、排卵不全及び性周期の長期化という現象が起こっていることが明らかとなった。マウスの配偶子形成過程において、雌雄ともに *Topors* が重要な機能を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We went on to analyze the roles for *Topors* protein during spermatogenesis, we generated the *Topors* deficient mice. Surprisingly, both of all *Topors*-KO males and females were infertile. At first, we analyzed about the phenotypes of *Topors*-KO males. Contrary to our expectations, they didn't show any defects in spermatogenesis, especially in XY body formation. But they have severe problems about sperm motility and reproductive behavior. About *Topors*-KO females, they revealed the ovulation failure and protracted the estradiol cycle. At the same time, wild type and *Topors*-KO females would be no significant change in the blood concentrations of estrogen. These results suggested that *Topors* protein have important roles in both males and females gametogenesis although mechanisms are still unclear.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	0	0	0
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：Topors、減数分裂、精子の運動能の低下、生殖行動、排卵不全、生周期の長期化

1. 研究開始当初の背景

配偶子形成において、減数分裂期は遺伝子情報の多様性を生み出すために重要なプロセスである。その際、雄の性染色体は相同性の少ない部分で対合するが、不對合な部分はヘテロクロマチン化し、XY体という特殊な核内構造を形成する。我々は、現在までにポリコーム群タンパク質複合体(PRC1)がXY体形成の維持に寄与している事を明らかにしてきた。さらに、その分子機構を明らかにする目的で、ポリコーム群タンパク質 Mph2 に結合し、精巣に強発現するタンパク質として Topors (Topoisomerase I and p53 binding RING finger protein) を同定した。Topors は癌抑制遺伝子としての機能を持つ可能性もあり、生体内における機能を解析する事は、発癌のメカニズムにも迫れる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

Topors は癌抑制遺伝子としての機能を持つ可能性もあったため、本研究では生体内における機能を解析することを目的として、Topors 遺伝子欠損マウスを作製した。まず最初は、精子形成過程の中でも特にXY体形成の維持に焦点を当て、Toporsの機能発現、及び Topors とポリコーム群タンパク質複合体との機能的相関を明らかにしていくことを目的とし、解析を開始した。

3. 研究の方法

主に、免疫染色の手技を用いた実験を行う。

(1) Topors 遺伝子欠損マウスを作成し、出

生率や妊孕性などを確認する。

(2) 雄が不妊だった場合、精巣切片を作成し、表現型の有無を確認する。また、Topors遺伝子欠損マウスの精母細胞におけるXY体形成の有無を様々なマーカーを用いて免疫染色によって明らかにする。

(2) 修飾ヒストンなどのヘテロクロマチン関連タンパク質の連続的な集積・排除によってXY体の構造は維持されるので、メチル化ヒストンH3K9、メチル化ヒストンH3K27やユビキチン化ヒストンH2Aなどの状態を免疫染色によって確認する。

(3) Topors自身がSUMO化の標的にもE3ライゲースにもなり得ることから、XY体におけるSUMO化にToporsが関与する可能性がある。また、精子形成過程において、SUMO化に関与するSUMO-1タンパク質はXY体に集積することが分かっている。そこで、Topors遺伝子欠損マウスの精母細胞を用いて、XY体におけるSUMOタンパク質の局在と、SUMO化の標的になるタンパク質(p53, HIPKなど)の局在を免疫染色を用いて検討する。

(4) Topors遺伝子欠損マウスでのXY体形成状態に異常が観察された場合、MSCIが起こっているかどうか、Cot-1を用いたRNA-FISHもしくはマイクロアレイ解析によって検討する。

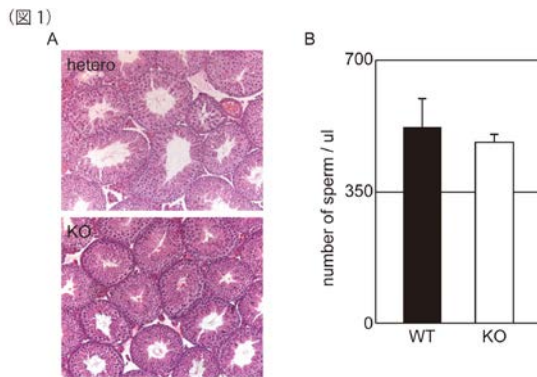
(5) XY体形成に特に異常が見られなかった場合、不妊の原因がどこにあるか様々な解析を行う。

(6) Topors遺伝子欠損マウスの雌も不妊であった場合、どこに異常があるかを明らかにするために、まずは形態学的解析を行う。

(7) XY体は雄のみの構造体であるので、それ以外の雌雄共通の表現型があるかどうか、あるのであればそのメカニズムの解析を行う。

4. 研究成果

Topors 遺伝子欠損マウスの出生率はメンデルの法則に則っておらず、詳細な解析の結果、出生直前で多くが死亡していることが分かった。Topors は肺にも発現が強いため、もしかしたら呼吸器系の異常で出生前後に死亡している可能性が高い可能性が示唆された。我々の焦点は生殖系であったため、次いで妊孕性について確かめたところ、予想に反して雄だけでなく雌も不妊である事がわかった。まず雄の Topors 遺伝子欠損マウスについて詳細な表現型解析を行ったところ、不妊であるにもかかわらず、予想していた XY 体形成のステージにも異常は観察されず、精子形成過程そのものにも、精子数にも異常は見られなかった (図 1)。つまり、精子形成過程は順調に進行していることが明らかとなった。

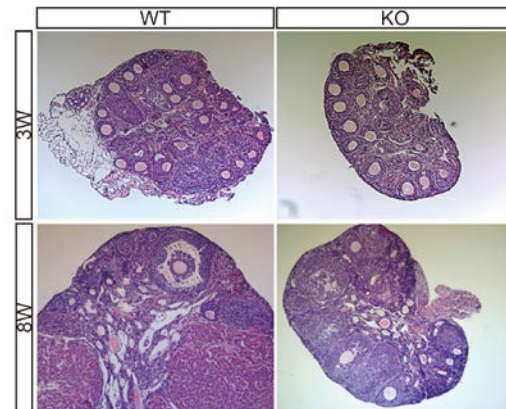


しかし、精巣上体に蓄積されている精子を抽出し、運動能 (直進率など) をカウントしたところ、Topors 遺伝子欠損マウスでは野生型に比べて、運動能が顕著に低下していることがわかった。このことから、XY 体形成よりもさらに後のステージである、精子形態形成成熟過程に異常があると考えられた。更に、夜間の生殖行動をマウンティングや射精の回数などを元に計測したところ、雄個体の生殖行動にも問題があることが明らかとなった。ヒトでの Topors タンパク質ミュータントは網膜色素変性症の患者が多いことから、夜間

の生殖行動の際、雌の識別ができなくなっている可能性も否定できない。また、Topors タンパク質は脳にも発現が高いことから、ホルモン分泌を介した行動制御を行っていることも考えられ、生殖行動の異常については、様々な可能性が考えられる。

次に、雌の Topors 遺伝子欠損マウスの表現型解析を行った。まず、組織切片を作製して形態学的な解析を行ったところ、3 週齢のマウスでは野生型との差は観察されなかった。しかし、8 週齢のマウスにおいて、野生型と比較して Topors 遺伝子欠損マウスでは、明らかに排卵が起こっていないことが明らかとなった (図 2)。

(図 2)



また、性周期を確認してみると、Topors 遺伝子欠損マウスでは、明らかに長期化していることが明らかとなった。しかし、エストロゲンの血中濃度には差がないことから、LH サージなどのホルモン分泌に影響があるかどうかは、はっきりとはしなかった。以上のことから、マウスの配偶子形成過程において、雌雄ともに Topors が重要な機能を果たしていることが示唆された。これらの結果については、現在論文投稿準備中である。しかし、Topors がこういったメカニズムに組み込まれているかまだ分かっておらず、また、雌雄共通の制御機構が存在するかどうかは明らかになっていないため、メカニズム解明にはさらに詳細な解析が必要である。我々の研究室において、Topors タン

パク質はポリコーム群タンパク質に結合するタンパク質として同定されている。もしかしたら、Topors 単独ではなく、ポリコーム群タンパク質と相互作用することで機能を果たしている可能性もあるため、今後は所属研究室において作成・維持しているポリコーム群遺伝子欠損マウスとの二重欠損マウスを作成して、遺伝学的な解析も必要になると考えられる。また、Topors がポリコーム群タンパク質と相互作用するとしたら、その際に形成しているであろう複合体の精製の実験も行ない、どのようなタンパク質とアソシエートしているかを解析しようと考えている。

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)

0 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 幸 (TAKADA YUKI)

独立行政法人理化学研究所・免疫器官形成研究グループ・基礎科学特別研究員

40392013