

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658234

研究課題名(和文)受精阻害遺伝子を利用したほ乳動物の産み分けに関する研究

研究課題名(英文) Study on the production of sex-selected offspring in mammals using fertilization inhibitory effect

研究代表者

南 直治郎(MINAMI, NAOJIRO)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30212236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本年度は精子形成時にmRNAが細胞間架橋通過を通過できないことが報告されているSmok1遺伝子の5'および3'領域を組み込んだ遺伝子を構築し、遺伝子組換えマウスを作出した。作出した雄マウスの1系統を解析した結果、子孫に遺伝子組換えマウスが得られたことから報告されているSmok1遺伝子の5'および3'領域には細胞間架橋の通過阻止機能はない可能性が示唆された。また、後代に組換え遺伝子を伝達しない雄マウスに組み込まれた遺伝子のコピー数を解析した結果、非常に多くのコピーが染色体に導入されていることが明らかとなったことから、受精阻害が導入遺伝子のコピー数に依存する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated to produce transgenic mice in which mRNAs were not able to pass through the cytoplasmic bridge during spermatogenesis. It has been reported that 5' and 3' untranslated regions of Smok1 gene prevent mRNA from the passage through the cytoplasmic bridge. However, one male transgenic mouse which carries the 5' and 3' untranslated region of Smok1 produced transgenic offspring, suggesting that these regions do not prevent the passage through the cytoplasmic bridge. In addition, we analyzed the copy number of transgene of another transgenic mouse that were not able to inherit the gene (the gene has fertilization inhibiting effect) to offspring. From the results, it is suggested that fertilization inhibiting effect of the gene depends on the copy number of transgene which is reconstituted in the chromosomes.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：産み分け 遺伝子組換え マウス

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の精子形成過程では、減数分裂時に隣接する細胞が細胞間架橋と呼ばれる構造によって数珠繋ぎの状態になり、物質の通過が可能になっている。これは X および Y 染色体にコードされた遺伝子の種類や数が異なっているため、X および Y 染色体を持つ精子がその形成過程でお互いの遺伝子産物を利用しあうことが理由ではないかと考えられている。また、自然界ではマウスにおいて t-ハプロタイプの伝達比のゆがみ(t-Haplotype Transmission Ratio Distortion)という現象が知られている。17 番染色体に t-ハプロタイプと呼ばれる大規模な変異をもつマウスが存在し、この変異を持つ雄の産仔には非常に高い比率でこの変異が伝えられる(最大で 99%)。この原因は、t-ハプロタイプをもつ精子が優位に受精することによるものであることが分かっており、この変異領域に存在する Smopk1 という遺伝子の 5'および 3'非翻訳領域によって、mRNA が細胞間架橋を通過できない機構が関与していることが示された。本研究は 21 年度科学研究費萌芽研究に採択された課題を発展させるものである。21-22 年度に半数体発現を示すプロタミン 1 プロモーターの下流にマーカー遺伝子である GFP と受精を阻害する遺伝子 A (特許出願のため遺伝子名は伏せる) を持つ組換え遺伝子を構築し、遺伝子組換え雄マウスを 6 系統作出した。これらの遺伝子組換えマウスを解析したところ、組換え遺伝子を持たない産子のみを産む雄マウスあるいは組換え個体が不妊である雄マウスの作出に成功した。

2. 研究の目的

ほ乳類においては産子の性を決定するのは精子であり、含まれる性染色体が X であれば雌、Y であれば雄が生まれる。そこで本研究では雌雄の産み分けを目的とし、X あるいは Y 染色体に受精を阻害する機構を導入して、

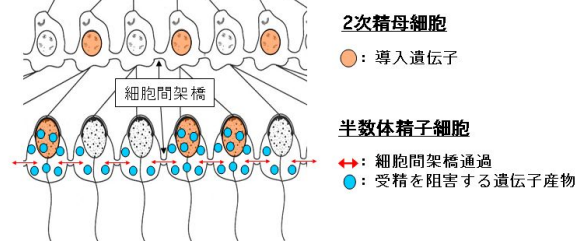
特定の性染色体を持つ精子が受精できない仕組みを開発する。この目的を達成するために、下記の 3 課題を達成する必要がある。

- 課題 1 . 遺伝子導入された個体が生産する精子が受精できない仕組みを開発する。
- 課題 2 . 導入遺伝子産物である mRNA および翻訳後のタンパク質が精子形成期の細胞間架橋を自由に通過できないような仕組みを開発する。
- 課題 3 . 上記 1 と 2 の機能を持つ組換え遺伝子を X あるいは Y 染色体の遺伝子発現領域にノックインし、性染色体に 1 と 2 の機能を持たせる。

3. 研究の方法

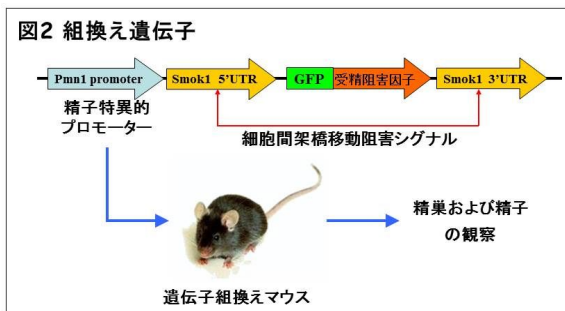
図 1 に示すように、精子の形成過程ではそれぞれの細胞が細胞間架橋という構造によって繋がった状態になっている。そのため仮に特定の染色体に受精できない遺伝子を導入しても、その受精阻害因子が隣接した細胞

図1 受精阻害物質が細胞間架橋を通じて隣接細胞へ移動する



に移動し、すべての精子が受精できなくなる。これまでの研究で、前述した課題 1 の受精阻害を目的とした 6 系統の遺伝子組換え雄マウスの作出を行い、交配実験を行った結果、3 系統が不妊であった。このことから、これら 3 系統のマウスでは受精阻害遺伝子 A が機能したことで不妊になったことが予測される。このことは、導入された組換え遺伝子産物が細胞間架橋を通過してすべての精子細胞に伝達されたため、すべての精子細胞で導入遺伝子産物が観察されたと考えられる。以上のことから、不妊マウスの精子を顕微授精あるいは

は体外受精によって受精させ後代の作出を行い、不妊と受精障害遺伝子の因果関係を検証する。前述した6系統の組換え雄マウスのうち、1系統のマウスでは生まれてくる産子がすべて組換え遺伝子を持っていないという予想外の結果も得られている。このことはこの組換え遺伝子 A を持った精子は受精できなく、この遺伝子を持っていない精子のみが受精したと解釈できる。これは、組換え遺伝子 A の産物が遺伝子 A を持ってない隣接細胞には伝わらなかったことを意味し、この組換えマウスにおいては組換え遺伝子産物が細胞間架橋を通過しない仕組みを備えていることになる。これについても、顕微授精や組換え遺伝子の挿入部位を検討し、予測が正しいかどうかについて検証する。課題2については Smok1 遺伝子の 5'および3'非翻訳領域をマーカー遺伝子である GFP および受精障害遺伝子と組み合わせた遺伝子を構築し、プロタミン1プロモーターの下流でこの遺伝子を発現する遺伝子組換えマウスを作出する(図2)。



課題3については近年 CRISPR/Cas9 システムという新しい遺伝子編集技術が開発されており、課題1および課題2が解決された場合に、この技術の利用可能性について検討する。

4. 研究成果

本研究は受精障害に関わる遺伝子を利用した、ほ乳動物の産み分け技術の開発を目的とした。昨年度作製した遺伝子組換え個体のうち、受精障害遺伝子 A が機能したことで雄

が不妊になった系統が3系統得られた。また、別の1系統では生まれてくる産子がすべて組換え遺伝子を持っていないという系統が得られた。後代に遺伝子組み換え産子を残さないこの1系統のマウスから採取・保存していた凍結精子を用いて、体外受精によって遺伝子組換えマウスを作出したが、得られた遺伝子組換えマウスが雌一匹であったため、現在交配によって雄の遺伝子組換えマウスを作製中である。また、この系統の雌マウスのゲノムを用いて、サザンブロッティングで導入された遺伝子のコピー数を検定した結果、正確なコピー数は得られなかったが、非常に多くのコピーが染色体へ導入されたことを示す結果が得られており、コピー数に依存した受精障害効果の可能性も示唆された。

不妊になった3系統のマウスでは、受精障害遺伝子産物が精子形成の過程で隣接するすべての精子細胞に伝達されたため、雄個体が不妊になったことが考えられる。そこで、遺伝子産物が隣接した細胞に移行しない機能を持つことが報告されている Smok1 遺伝子の上下流領域を受精障害遺伝子 A に接続した遺伝子を構築し(図2)、遺伝子組換えマウスを作出した結果、3系統の雄マウス、2系統の雌マウスが得られた。得られた雄系統のうち1系統においては雄個体からの産子が得られたが、後代に遺伝子組み換え産子が得られていることから、報告されている Smok1 遺伝子の5'および3'領域には細胞間架橋の通過阻止機能はない可能性が示唆された。他の系統においては現在交配実験を継続中である。また、上述した3系統の遺伝子組換えマウスが不妊になった別の可能性として、組換え遺伝子が複数の染色体に導入されたことも考えられるが、後代が得られていないため、解析はできない。この技術を完成させるための3番目の課題をクリアするためには、近年開発されたゲノム編集システムである CRISPR/Cas9 システムを利用することで、性

染色体への遺伝子のノックインが可能であると考えられる。本研究によって得られた受精阻害遺伝子を CRISPR/Cas9 システムを用いて性染色体に導入する際に、導入遺伝子に発現を増強する工夫を組み込むことによって、産み分け可能な雄個体の作出が期待できる。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

南 直治郎 (MINAMI, Naojiro)

研究者番号 : 30212236

(2)研究分担者

金子 武人 (KANEKO, Takehito)

研究者番号 : 30332878