

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670098

研究課題名(和文)生殖腺の形成と機能におけるmicroRNAの役割

研究課題名(英文)Functional analysis of microRNA in gonadogenesis and gonadal function.

## 研究代表者

高田 修治 (TAKADA, Shuji)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・部長

研究者番号：20382856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生殖腺の発生、分化、機能におけるマイクロRNAの役割を解析した。マイクロRNA 生合成の最終段階に関わるDicerをゲノム編集を応用することにより生殖腺特異的にKOするマウスは計画通りに作製できたが、実際には生殖腺でのKOができていない可能性が考えられた。生殖腺特異的に発現するmicroRNA-202の標的を生殖腺で強制発現させたマウスは野生型と変わらない表現型であった。microRNA-202 KOマウスのF2では卵巣が野生型に比べて黄体化しており、また多卵濾胞が多く観察された。以上より、一部のマイクロRNAは卵巣の機能に必要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Roles of microRNA in gonadogenesis and gonadal function were analyzed. Gonad specific knockout mouse of Dicer, that is essential for microRNA biogenesis, was designed based on genome editing. The mouse was generated as designed, but Dicer seems not to be knocked out. A transgenic mouse containing a forced expression cassette of a target gene of microRNA-202, which is expressed specifically in gonads, was generated, but the phenotype was indistinguishable to that of wild type mouse. Ovaries of F2 generation of microRNA-202 KO mouse were more luteinized than those of wild type, implying that some of microRNA have a role in ovarian function.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：マイクロRNA 生殖腺 マウス

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の胎仔期生殖腺は将来精巣、卵巣へも分化することができる、いわゆる "bipotential" な状態である。未分化な胎仔期生殖腺で Y 染色体上の雄決定遺伝子 *Sry* が発現すると雄では精巣が形成される。精巣と卵巣は生殖細胞を育て、ホルモンを賛成する点で特異な組織であるが、生殖腺内体細胞特異的に発現している遺伝子は見つからない。精巣、卵巣特異的に発現する遺伝子は生殖腺の形成や機能維持に重要な遺伝子であることが推測される。

マイクロ RNA は個体の発生や細胞分化、細胞の癌化等多様な生命現象に関与する事が示唆されているが、生殖腺形成や機能維持におけるマイクロ RNA の機能はほとんど分かっていない。胎生期の精巣形成の中盤ごろからマイクロ RNA の生合成に必須の *Dicer* をコンディショナル KO したマウスは報告されており、そのマウスでは不妊になることから、精巣の機能において何か機能していることは分かっているが、生殖腺形成の初期での機能は不明のままである。

私はこれまでに次世代シーケンサーを用いた独自の microRNA プロファイリング法を開発し、マウスの胎仔、成獣各組織の microRNA ボディマッププロジェクトを行い、マウス胚 11 ステージ、成獣 21 組織でのマイクロ RNA の発現状態を明らかにしてきた。このデータベースから、成獣の精巣、卵巣特異的に発現するものとして microRNA-202 を同定した。次世代シーケンサーによるボディマップからの同定であるため、data depth は深く、極めて特異的であると考えられた。さらに、この microRNA-202 の胎生期での発現解析を行い、生殖腺形成の極めて初期の段階から成獣に至るまで生殖腺特異的に発現していること、支持細胞で発現していることを明らかにしてきた。

microRNA-202 の標的に関しては先行研究によりバイオアッセイにより同定した。方法としては、ヒト cDNA をルシフェラーゼの 3' UTR に組み込んだ約 5,000 の独立クローンからなるライブラリーを用い、このライブラリーのプラスミドと microRNA-202 強制発現プラスミド、またはこのライブラリーのプラスミドと microRNA 発現プラスミド (microRNA は入れていない空ベクター) を培養細胞へ導入し、ルシフェラーゼの活性を測定することにより行った。microRNA-202 の標的の場合は microRNA-202 強制発現プラスミドを導入したときのみルシフェラーゼの活性が下がることにより microRNA-202 の標的を同定することができる。この方法により、一つの標的の同定に成功した。

### 2. 研究の目的

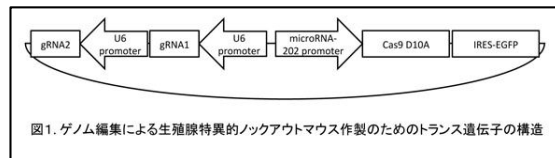
生殖腺の発生、分化、機能にマイクロ RNA が関与しているのかを明らかにする。生殖腺形成の初期にマイクロ RNA が存在しないマウ

スを作製するため、性決定におけるマイクロ RNA の機能が解明できる可能性がある。また、性分化への関与が考えられる場合には将来性分化関連疾患の原因の同定へと繋げて行きたい。

### 3. 研究の方法

(1) 生殖腺形成初期に *Dicer* 遺伝子をコンディショナルノックアウトするマウスの作製を試みた。*Dicer* は RNaseIII の一種をコードしており、コードするタンパク質はマイクロ RNA の生合成の最終段階で機能する。そのため、*Dicer* をノックアウトすることにより、マイクロ RNA が存在しない細胞を作製することができる。そのため、まず cre-loxP システムによる作製を試みた。これまでに microRNA-202 のプロモーターにより、胎仔期生殖腺の初期段階から遺伝子を強制発現させることが可能であることを見いだしているため、microRNA-202 のプロモーターに cre-ires-EGFP をつないだトランス遺伝子をマウスの受精卵に microinjection することによりマウスの作製を行った。得られたトランスジェニックマウスを ROSA26 locus に floxed stop-LacZ を持つマウスとかけ合わせ、cre の活性を測定した。

(2) ゲノム編集技術による *Dicer* 遺伝子コンディショナルノックアウトの作製を試みた。使用したコンストラクトを図 1 に示した。gRNA1 と gRNA2 は *Dicer* 遺伝子を標的にした。このコンストラクトではさらに、microRNA-202 のプロモーター存在下で Cas9 D10A を発現させることができる。ゲノム編集を基にコンディショナルノックアウトを行うため、off-target が問題となることが考えられる。そのため、ニッケースである Cas9 D10A を用いることによるノックアウトを行



うことにした。また、gRNA1 と gRNA2 の認識配列はニッケースによるノックアウトに適した配列とした。このコンストラクトの gRNA2 から EGFP までを受精卵に microinjection することによりマウスを作製した。方法としてはトランスジェニックマウス作製法と同じである。そのため、作製に要する時間を大幅に短縮できる。

(3) 既に TALEN により作製していた microRNA-202 ノックアウトマウスの F2 世代を掛け合わせにより作製し、成獣での表現型を解析した。

(4) マイクロ RNA はその物自体で機能するわけではなく、標的となる mRNA を介して機能する。そのため、microRNA-202 の標的遺伝子を生殖腺で強制発現させることにより、その機能の解析を試みた。その標的遺伝子は生

殖腺支持細胞では本来 microRNA-202 により翻訳が抑制されているため、標的遺伝子の強制発現により microRNA-202 をノックアウトした場合と同様の表現型を示すことが期待される。この実験を行うために、図 2 に示したコンストラクトを用いた。microRNA-202

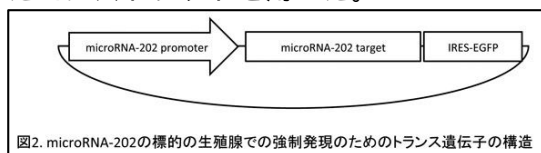


図2. microRNA-202の標的の生殖腺での強制発現のためのトランス遺伝子の構造

target と記したところには標的遺伝子の Open reading frame のみを用いた。このコンストラクトでは研究の方法 (1) で用いたものと同じ microRNA-202 プロモーターを使用することにより、生殖腺形成の初期から標的遺伝子の強制発現を行った。

#### 4. 研究成果

(1) microRNA-202 のプロモーター配列を用いることで、生殖腺特異的に cre を発現させることを試みた。ファウンダー世代のトランスジェニックマウスを 7 頭得る事ができた。そのうち、5 頭に妊孕性が確認できたため、得られたトランスジェニックマウスを ROSA26 locus に floxed-LacZ を持つマウスとかけ合わせ、胎仔期で生殖腺 cre の活性を測定したところ、一部の細胞で LacZ の活性が観測された。コンディショナルノックアウトでの表現型解析に使用できるレベルの cre の発現ではないと判断したため、この方法による解析は断念した。

(2) cre-loxP システムでのコンディショナルノックアウトが難しいため、次にゲノム編集による方法を試みた。マウスの受精卵に図 1 のトランス遺伝子を microinjection し、ファウンダー世代のトランスジェニックマウスを 3 頭得る事ができた。しかし、そのうちの 1 頭は germ line transmission しなかった。この方法ではファウンダー世代でも生殖腺特異的コンディショナルノックアウトとなっていることが想定されているため、germ line transmission しなかった 1 頭の成獣の精巢の表現型を組織学的に解析したが、野生型と変わらなかったため、精巢の機能不全ではなく、germ line transmission しなかったと判断した。残りの 2 頭は C57BL/6 にかけて、ヘテロのマウスを得た。これらは雄でも妊孕性が正常であったため、ゲノム編集によるノックアウトの効率が悪い可能性が考えられる。現在 F2 世代を作製しており、トランス遺伝子をホモで持つマウスにおいて妊孕性の確認、microRNA の発現量の確認をしていく必要がある。研究成果 (1)(2) から、残念ながら性決定、性分化におけるマイクロ RNA の関与を解析することができなかった。

(3) 既に TALEN により作製していた microRNA-202 ノックアウトマウスを C57BL/6 とかけ合わせて作製したヘテロの F1 同士をかけ合わせ、F2 世代を得た。目視による観察

ではホモ欠損の F2 と野生型に差は見られなかったが、組織切片にし、ヘマトキシリン・エオシン染色後観察したところ、ホモ欠損の F2 では野生型に比べて卵巣の黄体化が進行していた。またホモ欠損の F2 では野生型に比べて多卵濾胞が多く観察された。一方、精巣は目視による観察でも組織学的観察でもホモ欠損の F2 と野生に差はなかった。microRNA-202 は卵巣の形成か機能維持に関与していることが示唆された。

(4) microRNA-202 の標的 mRNA は生殖腺内では microRNA-202 により翻訳が抑制されている。そのため、microRNA-202 の標的遺伝子を生殖腺内で過剰に発現させることにより、microRNA-202 をノックアウトした場合と同様の表現型が得られると考えられる。図 2 に示したコンストラクトをマウスの受精卵に microinjection し、ファウンダー世代のトランスジェニックマウスを 6 頭得る事ができた。これらのトランスジェニックマウスを C57BL/6 にかけて合わせて得た F1 世代のマウスの生後の精巣と卵巣を取り出し、目視による観察を行ったが、野生型との差は見られなかった。その後、精巣と卵巣を組織切片にし、ヘマトキシリン・エオシン染色後観察した。その結果、トランスジェニックマウスと野生型マウスの間に差は認められなかった。このことから、強制発現による microRNA-202 の発現量が十分でなかった可能性と、microRNA-202 の標的が今回検討した mRNA 以外にも存在する可能性が考えられた。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高田 修治 (TAKADA, Shuji)  
国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・  
部長  
研究者番号：20382856

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：