

## 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：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21770245

研究課題名(和文)メダカ突然変異体の解析による始原生殖細胞の発生機構の解明

研究課題名(英文)Genetic dissection of early development of primordial germ cells using medaka (*Oryzias latipes*) mutants.

研究代表者

笹土 隆雄 (SASADO, Takao)

基礎生物学研究所・バイオリソース研究室・特別協力研究員

研究者番号：90511204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：始原生殖細胞の移動に異常が見られる3種のメダカ変異体の責任遺伝子を明らかにした。kamigamo、shimogamoの責任遺伝子は、それぞれ異なるヒト遺伝病の原因遺伝子であった。narutoの責任遺伝子は、mRNAの3'末端へのポリA付加サイトの選択に関する因子、CPSF6であった。naruto変異体では、3'UTRが短いsdf1が発現し、その発現場所が前方に異常に長いことが分かった。naruto変異体では、3'UTRの短いsdf1 mRNAが、miRNA等を介した消化から逃れる為にその後方へと濃い濃度勾配が失われ、その結果、始原生殖細胞が後方へと移動する方向性を失ったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Three medaka (*Oryzias latipes*) mutations, kamigamo, shimogamo, and naruto, affecting the migration of primordial germ cells (PGCs) were analyzed in this study. Responsible genes of the kamigamo and shimogamo mutations are known as causative genes of human genetic diseases. The gene responsible for the naruto mutation was CPSF6 required for 3' RNA cleavage and polyadenylation processing. 3'RACE showed sdf1 mRNAs with short 3'UTR were produced in the mutant embryos. Whole mount in situ hybridization showed the expression of sdf1 in the mutant somite is longer to the anterior side than in the wild type. The short 3'UTR of sdf1 may be prevented from performing posttranscriptional degeneration that is mediated by microRNAs in the anterior somites. This should disturb the gradient of sdf1 to the posterior positioned presumptive gonad-area. This will cause defects in posterior migration of PGCs in the mutant embryos.

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：始原生殖細胞 初期発生 細胞移動 小型魚類 メダカ 疾患モデル ケモカイン 遺伝子発現制御

### 1. 研究開始当初の背景

順遺伝学的スクリーニングによって作出された一連の変異体群の解析によって、注目した生命現象に関わる新規な分子機構の複合的な側面が明らかになると期待出来る。私は、脊椎動物で初めての始原生殖細胞の初期発生に焦点を絞った系統的な順遺伝学的スクリーニングをメダカを用いて行い、その結果、多数の変異体系統を作出した。収集した突然変異体の中からまず、始原生殖細胞の移動に異常を生じる2系統(*kazura*, *yanagi*)の解析を行い、その原因遺伝子が、どちらもケモカイン *sdf1/cxcl12* の受容体であるそれぞれ *cxcr4b* と *cxcr7* であることを明らかにした。この変異体の解析結果やそれまでの知見を総合して、始原生殖細胞が体細胞と相互に作用しながら予定生殖巣へと移動していく為の新しい分子機構、すなわち、始原生殖細胞に対して化学誘引物質(ケモアトラクタント)として働く *sdf1/cxcl12* とその受容体を中心とした機構が次第に明らかになってきた。

### 2. 研究の目的

始原生殖細胞は、生殖巣が形成される領域とは離れた場所で生まれ、胚発生過程において長い経路を通過して生殖巣原基に到達する。本研究は、脊椎動物における始原生殖細胞の移動に関わる分子機構を明らかにする為に、私がこれまでの研究で単離した複数のメダカ突然変異体を用いて、始原生殖細胞が胚のさまざまな場所で体細胞と相互作用しながら生殖巣原基にまで移動する機構、そしてその際の体細胞との相互作用を担う分子的实际体を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 始原生殖細胞が側板中胚葉に沿って後方へと移動する過程に異常が見られる3系統、*kamigamo*, *shimogamo*, *naruto* について、それぞれポジショナルクローニングによって原因遺伝子を特定する。

(2) 原因遺伝子が始原生殖細胞の移動にどの様に関わっているのかを解析する。特定された遺伝子の性質によって解析の手法は様々な異なると予想されるが、一例では以下の手法を用いる。ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法により、原因遺伝子とその関連する遺伝子が発現する場所と時期を調べる。変異体と野生型との間で始原生殖細胞や体細胞を相互に移植し、変異体の表現型が、始原生殖細胞に自立的に生じたものなのか、その移動する環境の体細胞からの作用によって生じたものなのかを調べる。

### 4. 研究成果

(1) 始原生殖細胞の移動に異常が見られる劣性胚性致死突然変異体、*kamigamo*, *shimogamo*, *naruto* の3系統について、全てポジショナル

クローニングによって責任遺伝子を明らかにした。*kamigamo*, *shimogamo* の責任遺伝子は、どちらもそれぞれ異なるヒト遺伝病の原因遺伝子として知られているものであった。その為に、今後のこれらの突然変異体の解析による知見は、始原生殖細胞の移動の分子機構の解明に新たな知見を与えるのみならず、これらのヒト疾患の発症の機構を解明する基礎研究として役立てられると期待出来る。

(2) 一方、*naruto* の責任遺伝子は、mRNAの3'末端にポリA配列が付加される際にシグナル配列を認識する複合体を構成する因子の一つである *CPSF6/CFIm68* だと分かった。そこでこれまでに始原生殖細胞の移動への関与が明らかになっているケモカインとその受容体、*sdf1/cxcl12*, *cxcr7* を3'RACEによって調べたところ、変異体胚では野生型よりも上流側でポリAの付加が起り、3'UTRの短いmRNAが生じていることが分かった。3'UTRは、microRNAに認識され、mRNAの安定性の制御や翻訳の制御に関わっている事が知られている。事実、*sdf1/cxcl12* の体節部における発現が変異体胚では前方に異常に長いことが分かった。従って *naruto* 変異体においては、胚前方における *sdf1/cxcl12* の適切な消失が起らない為にその濃度勾配が失われ、始原生殖細胞の後方への移動に異常が生じていると考えられた。今後この変異体の更なる解析により、始原生殖細胞の移動におけるケモカインシグナリングの詳細な発現調節機構だけでなく、様々な遺伝子の3'UTRが生体内においてmRNAの転写後調節にどの様に関わっているのかが明らかになると期待される。

### 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)

[雑誌論文](計2件)

成瀬清、木村哲晃、笹土隆雄、亀井保博。メダカバイオリソースプロジェクトの展開とその生物機能解析への応用。水産育種、42号、P.1-9。(2012)。(査読無)

Sasado, T., Tanaka, M., Kobayashi, K., Sato, T., Sakaizumi, M. and Naruse, K. The National BioResource Project Medaka (NBRP Medaka): An Integrated Bioresource for Biological and Biomedical Sciences. *Exp. Anim.*, 59, 13-24. (2010)。(査読有)

[学会発表](計9件)

Sasado, T., Naruse, K. Genetic dissection of primordial germ cell migration using *CPSF6/CFIm68* mutant medaka (*Oryzias latipes*). The 23rd CDB Meeting, Building

multicellular systems from Cellular Cross-Talk, Jan. 22, 2013. Kobe, Japan.

Seki, S., Lee, S., Iwasaki, Y., Yagisawa, M., Hiratsuka, T., Kusano, K., Miwa, M., Endo, S., Ishida, M., Sasado, T., Naruse, K., Yoshizaki, G., Production of donor-derived offspring by allogenic transplantation of vitrified germ cells in medaka, The 50th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, North Bethesda, 2013, U.S.A., Jul. 28-31.

Sasado, T., Naruse, K. Mutation in *CPSF6* causes short 3'UTRs and disturbs gene expression *in vivo*, as revealed by an analysis of primordial germ cell migration using the medaka mutant *naruto*. Asia-Pacific Developmental Biology Conference 2012, Oct. 5-8, 2012. Taipei, Taiwan.

Sasado, T., Naruse, K. Mutation in *CPSF6* causes short 3'UTRs and disturbs gene expression in developing embryos, as revealed by an analysis of a chemokine signaling in the migration of primordial germ cells using the medaka mutant *naruto*. The 58th/60th NIBB Conference, Germline Specification, Sex, and Stem Cells, Jul. 19 (18-21), 2012. Okazaki, Japan.

笹土隆雄, 成瀬清. 始原生殖細胞の移動に異常が見られる *CPSF6/CFIm68* 突然変異体 *naruto* において 3'UTR の短い mRNA が生じ、ケモカイン *cxcl12/sdf1* の遺伝子発現に異常が生じる. 第 35 回分子生物学学会年会, 2012 年 12 月 11 日, 福岡市.

Seki, S. Lee, S. Iwasaki, Y. Hiratsuka, T. Kusano, K. Endo, S. Sasado, T. Naruse, K. Yoshizaki G. Production of donor-derived offspring by allogenic transplantation of cryopreserved spermatogonia in medaka. 第 18 回小型魚類研究会, 2012 年 9 月 22 日, 京都市.

笹土隆雄, 成瀬清. 始原生殖細胞の移動に異常が見られる *cpsf6* 突然変異メダカ *naruto* の解析. 日本動物学会第 83 回大会, 2012 年 9 月 13 日, 大阪市.

笹土隆雄, 成瀬清. 始原生殖細胞の移動に異常が見られるメダカ突然変異体

*naruto* の遺伝学的解析. 第 34 回分子生物学学会年会, 2011 年 12 月 16 日, 横浜市.

Sasado, T., Naruse, K. Genetic dissection of the *naruto* mutant with defect in primordial germ cell migration in medaka (*Oryzias latipes*). The 1st Strategic Meeting for Medaka Research, Nov. 23, 2011. Okazaki, Japan.

#### 〔図書〕(計 3 件)

Kimura, T., Kamei Y., Takahna Y., Sasado, T., Naruse, K. Medaka genomics and the methods and resources for decoding genomic functions. In Denny P., Kole C., ed., Genome Mapping and Genomics in Laboratory Animals, (Springer, Berlin, Germany) pp159-182. (2012).

Sasado, T. Cryopreservation of medaka sperm. In Kinoshita, M., Murata, K., Naruse, K. and Tanaka, M., ed., Medaka - Biology, Management, and Experimental Protocols, (Wiley-Blackwell Co., Iowa, USA) pp105-116. (2009).

成瀬清, 笹土隆雄, 田中実, 酒泉満, 佐藤忠. 「メダカ: 生命科学研究の統合的生物資源を目指して」書名: パイオリソース&データベース活用術, 細胞工学分冊 (秀潤社) pp164-166, (2009).

#### 〔その他〕

ホームページ  
[http://www.nibb.ac.jp/bioresources/research\\_sa.html](http://www.nibb.ac.jp/bioresources/research_sa.html)

開発したメダカ精子凍結と人工受精の手法に関する技術講習会を計 4 回開催。

- 「メダカの精子凍結および人工授精」精子凍結・人工授精トレーニングコース, 2012 年 8 月 9-10 日, 基礎生物学研究所, 岡崎市  
<http://www.nibb.ac.jp/webmag/diary/study/2012/08/2906.html>

- "Cryopreservation of Medaka Sperm." The NIBB International Practical Course: Developmental Genetics of Zebrafish and Medaka. 2010 年 1 月 26-30 日, 及び, 2011 年 11 月 14-21 日, 基礎生物学研究所, 岡崎市.  
<http://www.nibb.ac.jp/webmag/diary/study/2011/11/2288.html>

- "Practical Workshop: *In vitro* fertilization and sperm cryopreservation in medaka (*Oryzias latipes*)." Institute of Toxicology and Genetics, 2010年3月29-31日, カールスルーエ工科大学, カールスルーエ, ドイツ連邦共和国.

開発した生物学実験実習を計4回学会発表。

- 笹土隆雄, 成瀬清, 木谷宝子, 恒川徹, 野村浩一郎. メダカを傷つけないで泳ぎ回る精子や受精する卵の様子を観察する実習. 日本生物教育学会第94回全国大会, 2014年1月11日, つくば市.
- 笹土隆雄, 成瀬清, 恒川徹, 村井正照, 野村浩一郎. メダカを傷つけないで人工授精を行う実習方法の改良. 日本生物教育学会第94回全国大会, 2013年1月13日, 広島市.
- 笹土隆雄, 成瀬清, 村井正照, 野村浩一郎. メダカを傷つけないで人工授精を行う方法. 日本生物教育学会第92回全国大会, 2012年1月8日, 神戸市.
- 笹土隆雄, 成瀬清, 野村浩一郎. 教育の現場における脊椎動物の実験教材としてのメダカ. -交配・産卵行動、受精・発生から遺伝およびトランスジェニック個体の観察に用いる-. 日本生物教育学会第86回全国大会, 2010年1月10日, 仙台市.
- 笹土隆雄, 成瀬清, 野村浩一郎. 脊椎動物の実験教材としてのメダカ. -交配・産卵行動、受精・発生から遺伝の観察に用いる-. 日本生物教育学会第86回全国大会, 2009年1月11日, 福岡市.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笹土 隆雄 (SASADO, Takao)  
基礎生物学研究所・バイオリソース研究室・特別協力研究員  
研究者番号: 90511204

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし