

機関番号：24402

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791570

研究課題名 (和文) 卵子の染色体異常と不妊に関する研究

研究課題名 (英文) Study on the chromosome aberration and infertility of an egg.

研究代表者

吉田 佳世 (YOSHIDA KAYO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30311921

研究成果の概要 (和文)：哺乳動物の減数分裂期の染色体動態の解明は不妊の原因究明や胎児の染色体異常において重要な課題であり、ヒトの不妊症の診断及び治療への発展が期待できる。申請者は、ヒストン H2AX 遺伝子が DNA 損傷の修復に関与することを明らかにした。このような DNA 損傷による不妊を解析するために、マウスの受精卵に X 線を照射し初期発生を解析した。さらに、ヒストン H2AX 遺伝子のノックアウトマウスを作製し、DNA 損傷後の影響を解析した。

研究成果の概要 (英文)：It is important to analyze the mechanisms of chromosome behavior in meiosis in mammals for chromosome aberrations in fetus. It will also contribute to diagnosis and treatment. We found that histone H2AX gene was involved in repair of DNA damages.

We analyzed the effect of DNA damages by X-irradiation to early development of embryos. Furthermore, we made histone H2AX knock-out mouse and analyzed its effect after DNA damages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：遺伝子、細胞・組織、発現制御、発生・分化、放射線

1. 研究開始当初の背景

わが国にとって少子化は重要な問題であり、晩婚化や不妊による影響も大きいと考えられる。近年、晩婚化が進む中、母体の年齢上昇に伴う胎児の染色体異常の発生

率が高まることは、出産を希望する女性にとって重大な不安要因である。また、年齢に関わらず健康な夫婦の 15%に見られる不妊症も、深刻な問題である。現在は、補助生殖医療技術 (ART) の技術が確立した反面、ARTに用いられる未受精卵は減

数分裂過程にあり、染色体分配は体外受精と同時に進行することから、胎児の染色体異常（異数性）の危険性が重要な問題となる。染色体の異数性がおこると胎性致死となることが多く、また、無事生まれることができて、21番染色体がトリソミーになるダウン症候群、性染色体数に異常が見られるクラインフェルター症候群などの疾患を伴うことがある。このような染色体の数の異常は、受精前後の染色体分配の異常と密接に関わると予想される。一方、胎児期に卵母細胞で起こったDNA損傷とその不完全な修復は染色体構造に異常が生じる可能性があり、受精卵は子宮に着床できず妊娠に至らないと考えられる。このような不妊は妊婦が妊娠を自覚するまでの間に起こるため、本人及び産婦人科医にも確認されにくいことから、表面化していないが重要な問題である。

2. 研究の目的

(1) 減数分裂期の染色体損傷と初期胚発生との関連を明らかにする。

(2) DNA損傷修復遺伝子ヒストンH2AX遺伝子欠損マウスにおける配偶子形成過程の染色体の構造異常の発生メカニズムの解明する。

3. 研究の方法

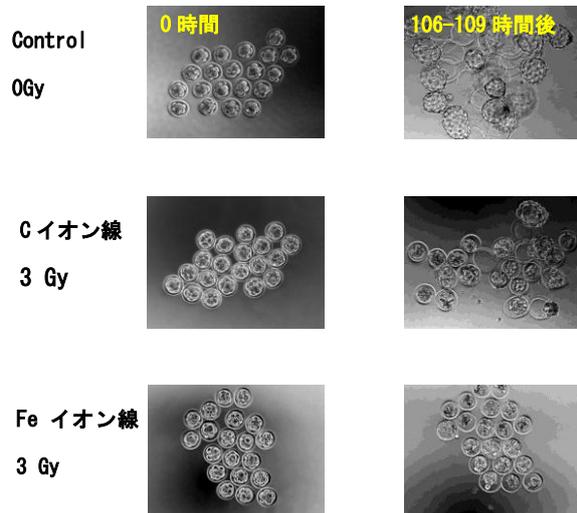
(1) 減数分裂期に発現する染色体動態に関与する遺伝子の欠損マウスは胚性致死となる。そこで、DNA損傷を起こした初期胚の発生の異常を解析する。

(2) DNA損傷を修復するヒストンH2AX遺伝子のノックアウトマウスを製作し、染色体構造異常について明らかにする。

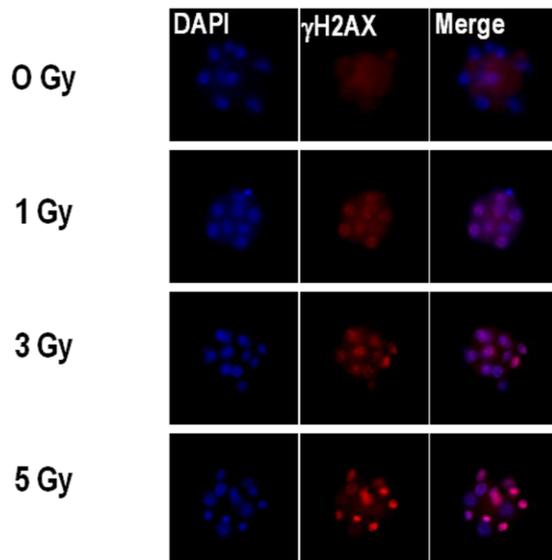
4. 研究成果

(1) 受精卵にX線、Cイオン、Feイオン線を照射し初期発生を解析すると、その直後はほとんどの初期胚は、正常であるが、約100時間後には、非照射サンプルでは、8細胞期胚はほとんど胚盤胞に発生し大きく膨張した後、ハッチングすることが示された。それに対して、3Gy Cイオン線を照射した胚では、一時的に胚盤胞を形成するが、最終的にハッチングできたものは1割以下であった。また3GyのFeイオン線照射では、一時的に胚盤胞を形成するが、最終的に全て死んでしまっ

た。Time Lapseを用いた観察では、胚盤胞を形成するために何度も膨張と収縮を繰り返かえし、死んでいく様子が観察できた(図1)。また、受精卵にX線を照射し、リン酸化ヒストンH2AXの抗体を用いて免疫染色したところ、X線増加に伴い、リン酸化ヒストンH2AXが局在するの確認できた(図2)。



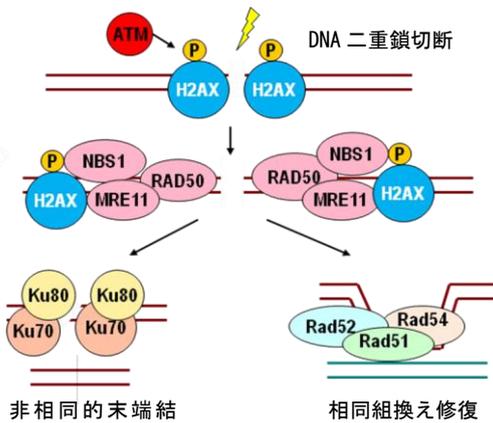
(図1) マウス受精卵(8細胞期胚)に対するX線, Feイオン線照射の影響



(図2) マウス受精卵におけるX線照射後のリン酸化ヒストンH2AXの発現

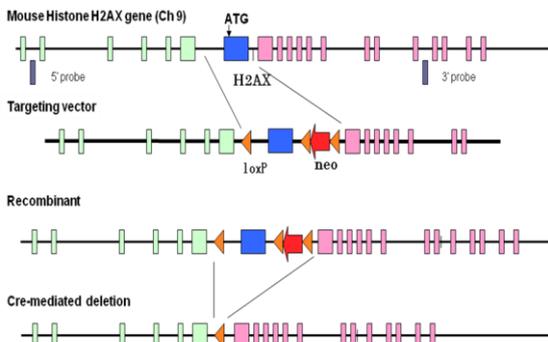
(2) 受精卵における修復遺伝子（ヒストン H2AX）の機能を解析するために、ヒストン H2AX 遺伝子欠損マウスを作製した。

DNA 二重鎖切断がおきると、その付近に結合するヒストン H2AX タンパクがリン酸化される。その後、Ku70, Ku80 などによる非相同末端結合や Rad51 などのタンパクによる相同組換えにより DNA 切断が修復される（図 3）。

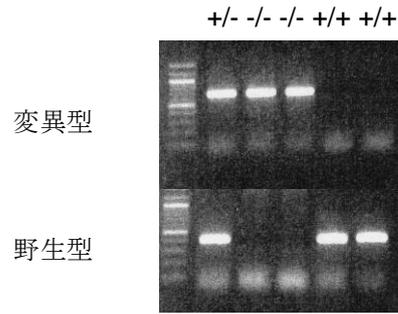


(図 3) DNA 二重鎖切断の修復

このヒストン H2AX 遺伝子を欠損させるために、ターゲティングベクターを作製した（図 4）。ヒストン H2AX 遺伝子の上流と下流に loxP の配列を挿入し、ネオマイシン耐性遺伝子により選択できるようなベクターを用いた。ES 細胞にこのベクターを導入し、組換え細胞を選んで、凝集法でキメラ胚を作製し、偽妊娠マウスの子宮に移植し、キメラマウス、さらにヘテロマウスを得て、最終的に Cre 発現マウスとの交配により、loxP 間で組換えし、ヒストン H2AX 遺伝子を欠損したマウスを作製した（図 5）。



(図 4) ヒストン H2AX 遺伝子のターゲティングベクター



(図 5) 作製したマウスについて PCR 法による H2AX 遺伝子の遺伝子型

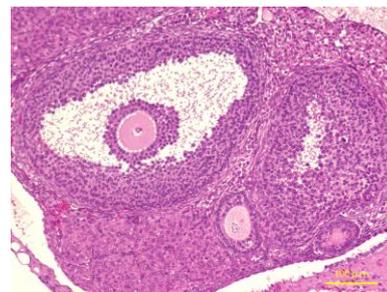
ヒストン H2AX 遺伝子欠損マウスは、ホモで生存可能であることが既に報告されている。しかし、ヒストン H2AX 欠損の雄マウスは不妊である。一方、ヒストン H2AX 欠損の雌マウスは不妊ではない。

ヒストン H2AX 欠損の雌マウスの卵巣を組織学的に解析したところ、野生型（図 7）に対してやや卵の数が少ないが、ヒストン H2AX 欠損マウスでも、成熟した卵がみられる（図 6）。したがって、DNA 修復遺伝子であるヒストン H2AX は、減数分裂の卵形成には、重要でないと考えられた。

今後、ヒストン H2AX 遺伝子欠損マウスの卵形成過程について、DNA 損傷との関係を考察したい。



(図 6) H2AX 遺伝子ノックアウトマウス（成体）の卵巣



(図 7) 野生型マウス（成体）の卵巣

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 1 件)

- ① Nagata K., Kiryu-Seo S., Maeda M., Yoshida K., Morita T., Kiyama H.
Damage-induced neuronal endopeptidase is critical for presynaptic formation of neuromuscular junctions
J Neurosci.
査読有、30 巻、2010、6954-6962

[学会発表] (計 6 件)

- ① Yoshida, K., Yoshida S., Eguchi-kasai K., Morita T.
Study on the Effect of Space Radiation to Mammalian ES and iPS Cells to Their Development
Journal Club (招待講演)、
2010年11月19日、
アメリカ合衆国NASAジョンソン宇宙センター

- ② 吉田佳世、吉田周平、笠井清美、森田隆
万能細胞 (ES, iPS 細胞) を用いた宇宙環境の影響の解析
日本宇宙生物科学会第 24 回大会、
2010 年 9 月 17 日、
東北大学・生命科学プロジェクト総合研究棟

- ③ Yoshida, K., Yoshida, S., Eguchi-kasai, K., Morita, T.
STUDY ON THE EFFECT OF SPACE RADIATION TO MAMMALIAN ES AND iPS CELLS TO THEIR DEVELOPMENT.
21st Annual NASA Space Radiation Investigator's Workshop、
2010年5月17日、
アメリカ合衆国ニューヨーク

- ④ 森田隆、吉田佳世、吉田周平、笠井清美
マウス万能細胞を用いた宇宙環境が哺乳動物細胞の発生と生殖細胞に及ぼす影響の解析
宇宙利用シンポジウム (第 26 回)、
2010 年 1 月 25 日、
宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究本部相模原キャンパス

- ⑤ Morita, T., Yoshida, K., Yoshida, S., Eguchi-kasai, K.
Development of Heavy Ion-Irradiated Mouse ES Cells.

日本宇宙生物科学会第 23 回大会、
2009 年 10 月 2 日、
JAXA 筑波宇宙センター

- ⑥ Yoshida, K., Yoshida, S., Eguchi-kasai, K., Morita, T.
Effect of Heavy Ion Radiation to Mouse ES Cells.
Heavy Ions In Therapy And Space Symposium 2009、
2009年7月7日、
ドイツ連邦共和国 ケルン

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/molecular-genetics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 佳世 (YOSHIDA KAYO)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：30311921

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究分担者

なし