

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：35503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570237

研究課題名(和文)非コードRNA作用複合体・クロマトイド小体による半数体ゲノム遺伝子量補正機構解明

研究課題名(英文)Study of non-coding RNA machinery complex-chromatoid body and dosage compensation.

研究代表者

佐藤 陽子 (SATO, YOKO)

東亜大学・医療学部・教授

研究者番号：50398963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞で見られ体細胞には見られないヌアージュは、円形精子細胞期にクロマトイド小体として存在している。ヌアージュは多種の動物で近年遺伝子発現への関与が報告されており、クロマトイド小体が細胞間橋を通して円形精子細胞間の移動を行うことから、精子形成時における遺伝子量補正に関与すると推測されてきた。本研究では、このクロマトイド小体の精子細胞における遺伝子量補正への関与と仕組みを明らかにするため、精細胞と支持細胞の共培養系を用い、物理的、化学的に検討を行い、まず遺伝子量補正の時期を明らかにした。さらに熱ストレス下条件を用いて、クロマトイド小体の動きは精子形成と関連性があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nuage, a hazy electron dense structure, is thought to have the role for control of gene expression, exists unique to germ cells not to the somatic cells and localizes as chromatoid body in the post meiotic haploid round spermatid. During the spermiogenesis, the chromatoid body containing miRNA machinery, moves between the round spermatids connected by cytoplasmic bridges and thought to have the relation to the dosage compensation. In the present study, using germ cells and Sertoli cells co-culture system, we analyzed the timing of the dosage compensation after disturbing the movement of chromatoid body by physical and chemical method. Furthermore, we showed that the movement of chromatoid body is participate in the spermatogenesis under heat shock condition.

研究分野：発生生物学、生殖生物学

キーワード：発生・分化 精子形成 遺伝子量補正 非コードRNA クロマトイド小体 熱ストレス 培養 精巢

## 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞には、核膜近くに体細胞にはない特徴的なヌアージュという構造体が存在し、多種の動物で近年遺伝子発現への関与が報告されてきた (Kotaja *et al.*, PNAS: 2006、Howings *et al.*, Cell: 2007, Lim *et al.*, PNAS: 2007)。哺乳類雄性生殖細胞で減数分裂期に見られるヌアージュは、円形精子細胞期にクロマトイド小体として存在する (Fawcett *et al.*, Biol Reprod: 1970)。クロマトイド小体は非コード RNA 結合因子・相互作用因子・調節因子を含むことから、非コード RNA 作用複合体として捉えられる。クロマトイド小体は細胞間橋を通して円形精子細胞間の移動を行うことから、ゲノム半数体化に伴う遺伝子量補正に関与すると推測されてきたが (Ventela *et al.*, Mol Biol Cell: 2003)、細胞間橋を維持して精子形成過程を再現できる *in vitro* の系が今まで存在しなかったため、クロマトイド小体の遺伝子量補正に関して直接的な証拠を得ることができなかった。最近哺乳類のヌアージュの構成蛋白は、RNA 干渉により胎生期及び減数分裂期の生殖細胞の遺伝子発現を制御していることが明らかとなっており (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, Gene Dev: 2008, Soper *et al.*, Dev Cell: 2008)、精子細胞におけるクロマトイド小体による遺伝子発現制御が期待される。

## 2. 研究の目的

我々はクロマトイド小体が細胞間橋を通じて円形精子細胞間で性染色体特異的な mRNA の運搬と翻訳制御を行うことにより、精子細胞間での遺伝子量補正を成立させると仮説をたてた。つまり、donor 円形精子細胞

の性染色体特異的な mRNA が recipient 精子細胞に運ばれ発現することにより recipient に不足している遺伝子量を得ること、また、donor 円形精子細胞では、donor のその性染色体特異的な mRNA の更なる翻訳を抑制することにより donor の遺伝子量が過剰になるのを防ぐこと、これら双方の仕組みにより遺伝子量補正が成立するという仮説である。この仮説を検証し、精子細胞におけるクロマトイド小体の遺伝子発現制御機能について明らかにする事を研究目的とした。

## 3. 研究の方法

性染色体特異的なマーカー遺伝子の円形精子細胞における遺伝子量補正の時期を確定後、細胞間橋を維持して精子形成過程を円形精子の後期まで再現可能な新規 *in vitro* 培養系を用いて、X-linked GFP マウスの精細胞を共培養し、X 円形精子細胞と Y 円形精子細胞を識別した上で、クロマトイド小体を物理的 (マニピュレーション及びレーザー照射) または化学的 (Red biarsenical fluorophore-assisted light inactivation (RALI) 法) で不活性化することにより、半数体精子細胞の遺伝子量補正におけるクロマトイド小体の必要性を明らかにする。さらに、クロマトイド小体構成蛋白機能破壊による small RNA 発現量の変化を検討することにより、クロマトイド小体構成蛋白の転写物の翻訳制御と遺伝子量補正への関与を明らかにする。全ての実験は X-linked GFP (Tg(GFPX)4Nagy/J) マウスを用いるため、X 円形精子と Y 円形精子を顕微鏡下、また、フローサイトメトリーにより分離して、いずれも donor として区別して扱うことができる。以上の実験よりクロマトイド小体の精子細胞における遺伝子量補正へ関与及び、遺伝子量補正の仕組みが明らかになる。

## 4. 研究成果

### (1) 性染色体特異的なマーカー遺伝子の遺伝子量補正時期の特定

当初の予定では、X-linked GFP 雄マウス由来の精細胞を使用する予定であったが、動物入手及び飼育許可等において、大学を異動したこともあり、使用することができなかった。そこで、通常の ICR 雄マウス由来の精細胞を用いて、申請者が開発したセルトリ細胞株を共培養し、円形精子細胞の異なる発生段階で酵素処理により細胞分離し、細胞間橋が閉鎖した円形精子細胞を回収し、性染色体上のマーカー遺伝子の遺伝子量補正が起こる時期を特定する事を試みた。円形精子期特異的に X, Y 両円形精子に発現が見られ、Y 染色体上にコードされている *Ubely* (Hendriksen PJ *et al.*, Dev Biol: 1995)、X 染色体上にコードされている *Akap4* (Nipper RW *et al.*, Mol Reprod Biol: 2005) と *Utp14b* (Zhao M *et al.*, Dev Biol: 2005) を遺伝子量補正に対する性染色体上のマーカーとした。評価方法は、例えば遺伝子量補正前に Y 染色体由来 *Ubely* は Y 精子細胞にのみ発現するが、補正後は X, Y 両精子細胞で発現するため、マーカー遺伝子を発現している精子細胞の割合が全体で 50% から 100% になる時期を *Ubely* 遺伝子量補正の時期と捉える。性染色体特異的なマーカー遺伝子 (*Ubely*, *Akap4*, *Utp14b*) の円形精子期における発現の検討を RT-PCR により行い、性染色体特異的なマーカー遺伝子の遺伝子量補正の時期を *in vivo* 及び *in vitro* で同定した。

### (2) クロマトイド小体の移動を止めた場合の遺伝子量補正への影響の検討

(1) と同様の共培養を行い、マーカー遺伝子の遺伝子量補正期前に、サイトカラシン B 処理によりクロマトイド小体の移動を止め培養を遺伝子量補正期まで続ける。その後、

酵素処理により細胞を分離回収し、性染色体上のマーカー遺伝子発現量を qRT-PCR 検討することにより、クロマトイド小体の移動停止の、遺伝子量補正への関与を検討した。しかし、サイトカラシン B の使用が共培養系に影響を与えたため、結果が不明瞭であった。

### 3) クロマトイド小体破壊による遺伝子量補正への影響の検討

サイトカラシン B は、クロマトイド小体以外の物質や細胞内小器官の移動も抑制する。クロマトイド小体以外の遺伝子量補正への関与を除外するため、X, Y 両染色体マーカー遺伝子の遺伝子量補正前に細胞間橋を持つ円形精子細胞のクロマトイド小体を物理的にレーザーまたはマイクロマニピュレーションにより物理的に破壊し (X 又は Y 円形精子細胞のみ、あるいは両方のクロマトイド小体を破壊した円形精子細胞を作成する。) 培養を遺伝子量補正期まで続け、遺伝子量補正は、マーカー遺伝子の発現を、(1) と同様に検討し明らかにすることを試みている。今後、X-linked GFP 雄マウス由来の精細胞を用いてこの物理的なクロマトイド小体の破壊により、遺伝子量補正がクロマトイド小体にのみ依存するかが明らかとなると思われる。

### (4) クロマトイド小体構成蛋白破壊のための RALI 法開発

クロマトイド小体構成蛋白を X-linked GFP マウスの精細胞で破壊するには、FITC 標識した抗体を用いた Fluorophore-assisted light inactivation (FALI) 法 (Guo J *et al.*, J Physiol., 2006) では、GFP 細胞全体に影響を及ぼすため、そのまま利用することはできない。そこで、新しく、GFP とは波長が異なり標的蛋白に特異的な色素付加が可能な ReASH (Red biarsenical fluorophore) を用いた RALI 法を考案した。ReASH-EDH2 に

結合した TC-tag 付き標的蛋白は、赤色光 (608nm) 照射を受けることにより、光励起された色素より一重項酸素が生成され、そのラジカルの影響で、蛋白質の構造変化により、機能的に不活性化すると考えられる (RALI 法)。ReASH-EDH2 に結合した TC-tag 付き標的蛋白作製のため、個々の標的蛋白遺伝子の C 末端側に tetracysteine receptor domain を結合させ、精細胞に transfection することにより TC-tag 付き recombinant protein として発現させる。この Tc-tag を発現した精細胞を細胞膜透過性の ReASH と incubation し Tc-tag に結合させ、次に 1,2-ethanedithiol (EDT) との incubation により ReASH の細胞毒性を抑制し、標的蛋白を ReASH-EDT2 にラベルする (Gaietta G *et al.*, Science:2002) 方法を考えた。精細胞への遺伝子導入の効率は非常に低く、この方法を検討するために、遺伝子導入方法、また、遺伝子導入後の精細胞の安定した分化状態を共培養下で誘導する方法を現在検討中である。安定した遺伝子導入かが可能になり、RALI 法の手法が確立後、クロマトイド小体構成蛋白の破壊による遺伝子量補正への影響の検討、クロマトイド小体構成蛋白の機能破壊による small RNA の挙動の検討を行い、各々のクロマトイド小体構成蛋白と性染色体特異的遺伝子の遺伝子量補正の関係や、クロマトイド構成蛋白が転写物の翻訳制御に関与した結果、ドナー側での遺伝子量補正を担っているかを明らかにしていきたい。

#### (5) クロマトイド小体の移動に関する熱ストレスについての検討

マウスなど熱ストレスにより精子形成が不全になる哺乳類精巣では、熱ストレスにより円形精子細胞で変化が起こり、クロマトイド小体の移動に異常が起こることが知られている。バンコクチュラロンコン大学において、熱ストレス下でも精子形成が正常に起こ

るゾウの停留精巣サンプルを使用し、精巣組織培養系を用いてクロマトイド小体を構成する MIWI, MILI をマーカーとしてクロマトイド小体の動きの解析を行った。結果、熱ストレス下でも正常精子形成を起こすゾウ精巣の円形精子では、熱ストレス下でもクロマトイド小体の動きは熱ストレスによる影響を受けていない事が明らかとなった。今後はこの熱ストレス下という実験条件を生かし、熱ストレスによるクロマトイド小体の動きが遺伝子量補正の段階にも影響を及ぼしているか解析をして行く予定である。

#### 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 21 件)

1. Taniguchi M, Wittarayath M, Morinaga K, Sato Y, Do LTK, Chatdarong K, Techakumphu M, Nii M, Otoi T. (2014) Chelation of trace elements in preservation medium influences the quality of boar spermatozoa during liquid preservation at 5°C for 4 weeks. *Cryo Letters*.35:336-344. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25282502>
2. Namula Z, Kodama R, Tanihara F, Morita Y, Sato Y, Wittayarath M, Taniguchi M, Otoi T. (2014) Effects of skim-milk supplementation on the quality and penetrating ability of boar semen after long-term preservation at 15 °C. *Acta Vet Hung*. 62:106-16. doi: 10.1556/AVet.2013.046.
3. Wittarayath, M., Ito, A., Taichi, K., Kodama, R., Namula, Z., Luu, V.V., Do, L.T., Sato, Y., Taniguchi, M., Otoi, T. (2014) Effects of green tea polyphenol on the quality of canine semen preserved long-term at 5°C. *Reprod. Biol.* 13:251-254. doi: 10.1016/j.repbio.2013.07.006.
4. Namura, Z., Sato, Y., Kodama, R., Morinaga, K., Luu, V.V., Taniguchi, M., Nakai, M., Tanihara, F., Kikuchi, K., Nagai, T., Otoi, T. (2013) Motility of boar semen after liquid preservation at 5°C for more than 2 weeks. *Anim. Sci. J.* 8:600-606. doi: 10.1111/asj.12049.

5. Sato, Y., Yoshida, K. Nozawa, S., Yoshiike, M., Arai, M., Otoi, T., Iwamoto, T. (2013) Establishment of adult mouse Sertoli cell lines by using starvation methods. *Reproduction* 45:505-516.
6. Sato, Y., Nozawa, S., Yoshiike, M., Otoi, T., Iwamoto, T. (2013) Glycoconjugates recognized by peanut agglutinin lectin in the inner acellular layer of the lamina propria of seminiferous tubules in human testes showing impaired spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 27: 659-668.  
doi: 10.1530/REP-12-0086.
7. Sato, Y., Taniguchi, M. and Otoi, T. (2012) Studying spermatogenesis by using *in vivo* and *in vitro* models: Advantages and disadvantages of these models for practical use. *J. Vet. Sci. Tech.* 3:115-123.  
doi: 10.4172/2157-7579
8. Takizawa, T., Ishikawa T, Kosuge T, Mizuguchi Y, Sato Y., Koji T, Araki Y, Takizawa T. (2012) Gene suppression of mouse testis *in vivo* using small interfering RNA derived from plasmid vectors. *Acta Histochem. Cytochem.* 45: 77-81.  
doi: 10.1267/ahc.11024
9. Wittayarat M, Taichi K, Kodama R, Namula Z, Chatdarong K, Techakumphu M, Sato Y., Tachiguchi M, Otoi T. (2012) Long-term preservation of chilled canine semen using vitamin C in combination with green tea polyphenol. *Cryo Letters* 33: 318-26.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22987243>
10. Kaedei Y, Naito M, Naoi H, Sato Y., Taniguchi M, Tanihara F, Kikuchi K, Nagai T and Otoi T. (2012) Effects of (-)-epigallocatechin gallate on the motility and penetrability of frozen-thawed boar spermatozoa incubated in the fertilization medium. *Reprod. Dom. Anim.* 47: 880-886.  
doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.01984.x.

〔学会発表〕(計7件)

1. Y. Sato, T. Tharasanit, N. Tipatanavattana, C. Somgrid, C. Thitaram, S. Mahasawangkul, T. Otoi, M. Techakumphu.  
Molecular analysis of testicular cells in Asian elephant (*Elephas maximus*) cryptorchid testis. The 12<sup>th</sup> International Symposium on Spermatology (2014, August, Newcastle

University, Australia)

2. L.T.K. Do, Y. Sato, M. Taniguchi, T. Otoi.  
Trichostatin a treatment effects on *in vitro* development of interspecies nuclear transfer cat embryos depend on recipient cytoplasm species.  
41th annual conference of international embryo transfer society. (2015 Jan., Versailles, France)
3. L.T.K.Do, V.V.Luu, Y. Sato, M. Taniguchi, T. Otoi.  
Astaxanthin effects on maturation, fertilization and development of porcine oocytes cultured under heat stress.  
40th annual conference of international embryo transfer society. (2014 Jan., Reno, Nevada, US)
4. T. Terazono, M. Takagi, K. Akiyama, Y. Sato, M. Taniguchi, T. Otoi.  
Long-term ovarian function after grafting to peripheral body site in a dog.  
The 3<sup>rd</sup> Word Congress of the International Society for Fertility Preservation. (2013 Nov., Valencia, Spain)
5. M. Wittayarat, Z. Namula, V.V. Luu, L.T.K.Do, Y. Sato, M. Taniguchi, T. Otoi.  
Effect of Trichostatin A on *in vitro* embryo development of interspecies nuclear transfer embryos reconstructed from cat donor nuclei and bovine cytoplasm. (2013 Jan., Hannover, Germany).

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 陽子 (SATO, Yoko)  
東亜大学・医療学部・教授  
研究者番号：50398963

(2)研究分担者

音井 威重 (OTOI, Takeshige)  
山口大学・共同獣医学部・教授  
研究者番号：30311814