

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14369

研究課題名(和文)条件付きY染色体遺伝子改変マウスの開発

研究課題名(英文)Development of applicable methods for advanced gene targeting on mouse Y chromosome

研究代表者

松本 高広 (MATSUMOTO, Takahiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・准教授

研究者番号：70447374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではY染色体の非同組換え領域に座位するDBYおよび多コピー遺伝子RbMYの組織特異的遺伝子改変マウスを開発することを目的とした。挿入型ベクター法及びCRISPR/Cas9法によりDby floxマウスを取得した。これらflox系統と生殖細胞特異的Cre発現マウス、神経細胞特異的Creマウスとの交配により、組織特異的Dby遺伝子欠損マウスの作出に成功した。一方、Y染色体上の多コピー遺伝子については、3種の人工miRNAをタンデムにつなげた発現ベクターを構築し、30コピー以上存在するRbmy遺伝子ノックダウン・トランスジェニックマウスの作出に成功した。

研究成果の概要(英文)：The Y chromosome is male-specific chromosome and considered to be critical for sexual differentiation and male physiology and behavior. However, its physiological impact has been elusive, owing to the lack of a mouse genetic model. The targeted disruption of the Y-linked genes in mouse ES cells has not been successful, because conventional homologous recombination is hampered by the unique structural features of the Y chromosome. We have overcome this problem and generated floxed mouse line, by using a site-directed insertion vector and CRISPR/Cas9 system. Moreover, we developed multi-copy Y gene knockdown transgenic mice with co-cistronic expression of three miRNA hairpins.

研究分野：分子生物学

キーワード：Y染色体

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の雌雄間には生殖器の顕著な差異を始めとして、骨格パターンや免疫、代謝、さらに神経機能や行動パターンなど種々の性差が存在する。従来より、こうした性差は生殖腺から分泌される性ホルモン作用により形成されると考えられてきた。しかし、雌雄間には性ホルモンに依存しない身長差などが存在することなどから、性差を生じる遺伝学的基盤には性染色体上に位置する遺伝子が強く寄与すると推察される。Y染色体は哺乳類における唯一の遺伝学的差異であり、雄性においてのみ存在する染色体である。近年、Y染色体のゲノム配列が解読され、ヒトY染色体には27種のタンパク質コード遺伝子と25種のnon-coding遺伝子が存在することが明らかとなった。これらY染色体の遺伝子の大半は減数分裂時にX染色体と相同組換えを起こさない非相同領域に存在し、この非相同領域の遺伝子の働きが雄特有の性差を生み出すと考えられる。Y染色体は元来同一染色体対であった原型の染色体対の一方に生じた段階的な相同組換え阻害によって、欠失や脱落を繰り返し現在のサイズになったと考えられている。その進化の過程で、反復配列に富み、遺伝子の半数以上が多コピー遺伝子となる常染色体とは異なるY染色体固有の特徴を獲得した。ヒトY染色体非相同領域は反復配列から成る約40 Mbの長腕領域と長腕・短腕にそれぞれ8 Mbと14.5 Mbのユークロマチン領域に分けられる。遺伝子が存在するユークロマチン領域は、X染色体から転座で生じたX-transposed領域、X染色体とホモロジーがあり、かつY染色体に特徴的配列を有するX-degenerated領域、及びY染色体特異的なAmplificonic領域に分類される。しかしながら、Y染色体遺伝子の生理機能や分子機能はそのほとんどが未知である。

2. 研究の目的

哺乳類における雄性化のプロセスは、Y染色体と男性ホルモン作用により制御される。近年、雄性化における内分泌制御についてはアンドロゲン受容体による転写調節機構や生体内高次機能の詳細が明らかとなっている。一方、Y染色体の遺伝子の中で唯一機能が判明しているのは精巣決定因子であるSRYのみであり、雄性特異的な生理機能を決定づけるY染色体遺伝子は未同定である。この主な要因として、Y染色体はその構造的特徴により遺伝子改変技術の適用が困難な点が挙げられる。すなわち、

Y染色体は両端に存在する偽常染色体領域(PAR)を除き95%は非相同組換え領域(雄性特異的領域)が占め、Y染色体固有の配列から構成されている。生殖細胞における減数分裂では、YおよびX染色体はPARを介して対合し、組み換えが行なわれるが、非相同領域においてはX染色体との間に相同組換えは起こらない。従って、相同組換え効率に依存した従来の遺伝子ターゲティング法は適用できず、遺伝子欠損マウスの作出が不可能であった。また、Y染色体遺伝子欠損マウスは不妊を呈すると予想されるため、Y染色体の変異マウスの作出にはCre-loxPシステムを用いた条件付きfloxed系統が有効であると考えられるが、これまでY染色体floxedマウス作出の報告例はない。

一方、Y染色体のもう1つの構造的特徴として、非相同領域には反復配列から成る8つの巨大パリンドローム構造が構築され、そこには多コピー遺伝子群が座位するといった特異性を獲得している。この反復配列は膨大な数ゆえに、これまでの研究の世界的動向はゲノム解読に尽力されてきており、マウスY染色体に至っては2014年11月にゲノム解読が完了している。これら多コピー遺伝子は、同一染色体内で、つまり相同ペア(Xペア)なしでもパリンドローム領域内で相同組換えを可能にし、雄性において独自に進化を遂げてきたと推測されている。その生物学的意義に興味を持たれるが、研究アプローチの難しさから解析がなされていない状況である。したがって、Y染色体のfloxedマウスや多コピー遺伝子ノックダウンマウス等の遺伝子工学の開発は喫緊の課題である。

本研究ではY染色体の非相同組換え領域に座位するDbyおよび多コピー遺伝子Rbmyの組織特異的遺伝子改変マウスを開発することにより、これまで技術的に困難であったY染色体の生体内機能の解析系を確立し、ひいてはY染色体特異的RNAプログラムを介した雄性化機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) Dby遺伝子座に対する挿入型ターゲティングベクターを構築し、ES細胞内の標的遺伝子組換えによるloxP配列の挿入を試みた。また、CRISPR/Cas9法を用い、受精卵へのloxP配列の挿入によるfloxed系統の作出を試みた。

(2)多コピー遺伝子 Rbmy を標的とした人工 miRNA 発現ベクターを構築し、定法によりトランスジェニックマウスの作出を試みた。

4. 研究成果

(1) 標的相同部位が一カ所で組み換えを起こす原理に基づき、置換型ベクターに比べ高頻度で組み換えを起こす挿入型ターゲティングベクターを構築した。次に、ES細胞に挿入型ターゲティングベクターにより loxP 配列を導入し、G418 による薬剤選択を行い相同組換え体を取得した。次に、得られた相同組換え体に、2 回目の loxP 配列を導入し、Puromycin による薬剤選択により、Dby 遺伝子座の 2ヶ所に loxP 配列を挿入した ES 細胞の取得に成功した。この ES 細胞を用い、アグリゲーション法によりキメラマウスを作出した後、定法により flox マウスの作出に成功した。また同時に、エレクトロポレーション法によるマウス受精卵への核酸導入技術と CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集技術を組み合わせることで Dby flox マウスの作出を試みた。gRNA、Cas9 およびドナー DNA をエレクトロポレーションにより受精卵へ導入し、得られた 1カ所の loxP 配列の挿入系統の受精卵を用い、同法により Dby 遺伝子座の 2ヶ所に loxP 配列を挿入した flox マウスの樹立に成功した。これら flox 系統と生殖細胞特異的 Tnap-Cre 発現マウス、神経細胞特異的 Nestin-Cre 発現マウスとの交配により、組織特異的 Dby 遺伝子欠損マウスの作出に成功した。

(2) Rbmy 遺伝子については、人工 miRNA 発現によるノックダウンマウスの作出を試み、培養細胞にてノックダウン効率の高かった 3種の人工 miRNA をタンデムにつなげた発現ベクターを構築し、定法によりトランスジェニックマウスの作出に成功した。

これらの研究により、条件付き Y 染色体遺伝子欠損マウスと Y 染色体多コピー遺伝子ノックダウンマウスの作出法が確立し、Y 染色体遺伝子群の高次生体機能の解析が可能となった。

Y 染色体は反復配列に富み、似た配列が広く散在している。そのため、減数分裂時に不均等な姉妹染色体分体交換が発生し、Y 染色体配列の一部の重複や欠失、転座が生じることがある。これまで Y 染色体異常に由来する遺伝子疾患の症例からその生理

機能との関連が示唆される Y 染色体領域が報告されてきた。領域欠損による疾患症例から見出された責任領域としては、二つ報告されている。一つは性ホルモンに依存しない身長性の差を規定する Y 染色体特異的成長遺伝子領域 (GCY) であり、ヒト Y 染色体長腕セントロメア近傍の 2 Mb 領域が候補領域となっているが、責任遺伝子の同定には至っていない。もう一つは精子形成責任領域 (AZF) である。Y 染色体の微小欠損は男性不妊症のおよそ 5% に認められ、Y 染色体長腕上に四カ所マッピングされている。一方、Y 染色体の転座による遺伝子疾患としては、性腺芽細胞腫の責任候補領域として短腕セントロメア近傍に GBY 領域が同定されている。DBY 遺伝子は AZF 領域に、RBM Y 遺伝子座は AZF 及び GBY 領域に位置するが、こうした領域には複数の遺伝子が存在しており責任遺伝子は明確にされていない。条件付き遺伝子改変マウスはこうした Y 染色体遺伝子疾患モデル動物となり、病態の解明や治療法の開発のツールとなることが期待される。

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)

Matsushita S., Suzuki K., Ogino Y., Hino S., Sato T., Suyama M., Matsumoto T., Omori A., Inoue S., Yamada G. Androgen regulates Mafk expression through its 3'UTR during mouse urethral masculinization. *Endocrinology* 157, 844-857 (2015) (査読有)

DOI:10.1210/en.2015-1586

Takahashi S., Arura S., Yamamoto Y., Matsumoto T., Kitamura T., Homma Y. Urinary oxalate excretion decreased in androgen receptor-knockout mice by suppressing oxalate synthesis in the liver. *Open Journal of Urology* 5, 123-132 (2015) (査読有)

DOI:10.4236/oju.2015.58020

[学会発表](計 1 件)

西田恭子、武田知起、松本高広、本田伸一郎、石井裕次、山田英之「ダイオキシンによる出生児の性未成熟の機構:ゴナドトロピン放出ホルモン神経への影響」

フォーラム 2016：衛生学・環境トキシ
コロジー 2016年9月10日、昭和大学
旗の台キャンパス（東京都・品川区）

〔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

松本 高広（MATSUMOTO, Takahiro）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号：70447374

(2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

（ ）

研究者番号：

(4)研究協力者

（ ）