

平成22年 5月17日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007年度～2009年度

課題番号：19380158

研究課題名（和文）卵子特異的遺伝子 Oog1 の機能解析と胚性ゲノム活性化の分子基盤

研究課題名（英文）Analysis of oocyte-specific gene, Oog1 and its involvement in molecular basis of zygotic gene activation

研究代表者

南 直治郎（MINAMI NAOJIRO）

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：30212236

研究成果の概要（和文）：本研究では、卵母細胞に特異的に発現する遺伝子 Oog1 の機能について解析を行った。Oog1 は筆者らが新規に同定した遺伝子であり、胚性ゲノムの活性化時期に受精卵の核内に移行する。その機能を解析するために、受精卵において Oog1 ノックダウンするトランスジェニックマウスを作出し、その表現形を解析した。さらに、減数分裂期の Oog1 タンパク質の局在について解析を行い、Oog1 遺伝子が減数分裂期前期に卵母細胞の核に存在することを明らかにした。また、この遺伝子の発現を制御している領域の解析を行い、遺伝子制御領域を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated the function of oocyte-specific gene, Oog1. The gene translocates to the nucleus of fertilized embryos at the time of zygotic gene activation. In order to analyze the function of the gene, we produced the transgenic mice in which the mRNA of Oog1 is knockdown. In addition, we investigated the protein expression of Oog1 during female meiosis and it is revealed that the protein exists in the oocyte nucleus at the prophase of meiosis. In another experiments, we identified the regulatory regions of Oog1 which controls the expression of the gene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：発生工学

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は受精卵に発現する遺伝子を解析する過程で、卵子特異的に発現する遺伝子 Oog1 を同定した（Minami ら、2001）。近年のマウスゲノムデータベースの充実により、Oog1 がゲノム

上に複数コピー存在することが明らかになり、これまでの相同組換えを利用したノックアウトマウス作出による遺伝子機能の解明が困難であることが判明した。しかし、2本鎖のRNAが相補的な配列をもつ mRNA を特異的に分解、あるいはタ

タンパク質への翻訳を抑制することで、特定のタンパク質の機能を解析する RNA 干渉(RNAi)法が開発され、ほ乳類の卵子と初期胚においても、この手法が効果的な遺伝子サイレンシングを引き起こすことが報告されている(Wianny ら、2000)。そこで、ノックアウトマウスに代わる遺伝子解析手法として、RNA 干渉法を利用して *Oog1* の機能を明らかにすることとした。これまでに、卵母細胞に特異的に発現するいくつかの物質についてその機能解析が行われているが、詳細な分子生物学的な解析が行われているものは数少ない。ほ乳動物における生命の誕生から個体発生までの仕組みを正確に理解する上でも、卵母細胞特異的に発現する遺伝子の機能をを解明することは非常に重要な意味を持つ。

## 2. 研究の目的

*Oog1* は胎齢 15.5 日の胎仔卵巣内卵子で発現を開始し、受精後 2 細胞期まで存在し、その後急速に分解される。また、*Oog1* タンパク質が 1 細胞期の後期から 2 細胞期の初期にかけて核内に移行することが示された。このことから *Oog1* は卵母細胞内で合成・蓄積され受精後の発生に機能する物質ではないかと推測された。一般に卵母細胞に貯えられた遺伝情報(転写産物:mRNA)は受精後の数時間から数日ではほぼ使い果たされ、発生を維持するためには胚自身(受精後)のゲノムから新たに転写産物を作り出す必要がある。この生命誕生後最初の遺伝子発現の開始を「胚性ゲノムの活性化」と呼んでいる。この胚性ゲノムの活性化の引き金を引く物質は卵母細胞に蓄えられ、受精後の発生を制御すると考えられている。これらの物質は一般的に母性効果遺伝子とよばれ、これまでにいくつか同定されている。マウス受精卵において胚性ゲノムの活性化は 1 細胞期後期から 2 細胞期前期に起こることが知られているが、その分子機構はまったく解明されておらず、卵母細胞に特異的に発現する遺伝子の機能を解析することによって、胚性ゲノムの分子メカニズムをより詳細に解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

これまでに、未知の遺伝子の機能を解析する方法として最も一般的に用いられている方法はノックアウトマウスを利用した解析である。目的の遺伝子を欠損させたマウスを作製し、解析する組織における表現形によって、その遺伝子の機能を予測し、その後さまざまな分子生物学的手法を用いて遺伝子の機能解析を行っている。著者らは卵母細胞に特異的に発現する遺伝子 *Oog1* の同定を行ったが、この遺伝子がゲノム上に複数コピー存在することを明らかにした。複数コピー存在する遺伝子においては上記のノックアウトマウスの作製は不可能であるため、近年開発された 2 本鎖 RNA を用いた RNAi 法による解析を試みた。2 本鎖 RNAi 法とは細胞内で

発現した 2 本鎖の RNA が Dicer によって短鎖 RNA に切断され、その RNA と相補的な配列を持つ mRNA を特異的に分解、あるいはタンパク質への翻訳を抑制することで、その遺伝子の機能を解析する方法のことである。そこで本研究では、*Oog1* に相補的な 2 本鎖 RNA を発現する組換えマウスを作製し、このマウスにおける表現形を検討することで、*Oog1* 遺伝子の解析を試みた。組換え遺伝子の発現制御には卵子特異的発現を示す ZP3 プロモーターを用いた。ZP3 遺伝子のプロモーター領域の下流に外来遺伝子である GFP と *Oog1* 遺伝子が逆向きになるような配列を連結した組換えベクターを作製し、受精卵に顕微注入することによって、*Oog1* へアピン 2 本鎖 RNA を発現する組換えマウスを作製した。ZP3 プロモーターは卵子形成期の遺伝子発現を促進することから、*Oog1* 遺伝子の発現が開始する卵子形成時期に RNAi 効果を発揮する個体を作製することができる。この組換えマウスを解析することによって、*Oog1* タンパク質をもたない卵子の形態やその後の発生能を検討することができる。*Oog1* は卵子特異的に発現する遺伝子であるので、その機能を阻害しても致死となることは考えにくい。作出した組換えマウスの卵巣切片を *Oog1* 特異的抗体で免疫染色することによって、卵子形成におよぼす影響を検討する。卵子形成が正常に行われている場合は、TG マウスの雌から卵子を回収し、RT-PCR とウェスタンブロットングによって *Oog1* 遺伝子の発現抑制を確認する。また、正常雄マウスと交配した後、受精卵を回収しその後の発生能を検討した。

## 4. 研究成果

組換えマウス作製のためのベクターを図 1 に示す。この組換え遺伝子をマウス受精卵の雄性前核に顕微注入し、9 系統の組換えマウスを作出した。これら 9 系統のマウスのうち、生存して

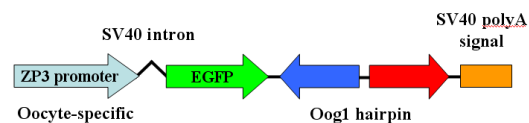


図 1 *Oog1*ノックダウンマウス作製のための組換えベクター

いる 6 系統について GV 期卵母細胞における mRNA 量をリアルタイム PCR 法によって解析した結果、図 2 に示すように、A および F 系統において mRNA 量が顕著に抑制されていることが明らかとなった。これらのことから、設計した *Oog1* の 2 本鎖 RNA 発現ベクターはゲノムに挿入され、正常に機能していると考えられた。次に、これらの系統の雌マウスを野生型の雄マウスと交配させて得られた受精卵を体外培養し、胚盤胞期までの発生について検討した。*Oog1* が受精後に機能しているならば、*Oog1* がノックダウン

された卵子は発生に何らかの影響が出ると考え

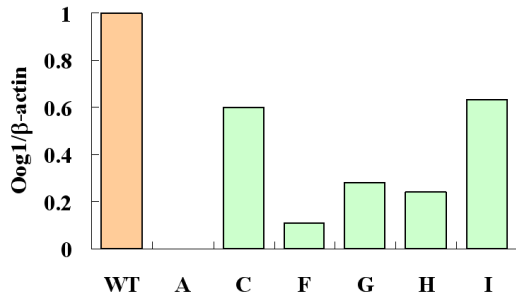


図2 Oog1ノックダウンマウスの卵母細胞におけるmRNA量

られる。しかしながら、図3に示すように、受精卵の発生率に関しては mRNA の抑制との相関はなく、すべての系統において、野生型とほぼ同様の発生率を示した。このことは、まったくの予

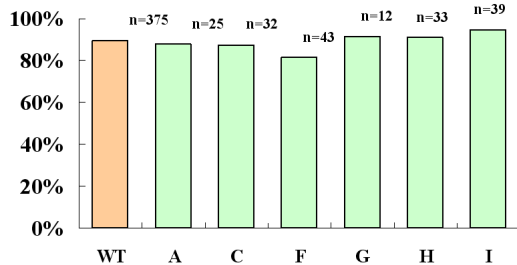


図3 Oog1ノックダウンマウス受精卵の発生率

想外であったため、次に Oog1 ノックダウンマウスの卵母細胞におけるタンパク質解析をウェスタンブロット法を用いて行った。図4に示すように、Oog1 ノックダウンマウスの卵母細胞においても、20kDa、29kDa、56kDaのすべての種類のOog1 タンパク質が検出された。このことから、受

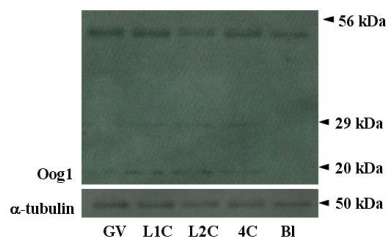


図4 Oog1ノックダウンマウスの初期胚におけるタンパク質発現解析

精卵の発生が正常に進んだことは Oog1 タンパク質が卵母細胞内に残存したことが原因ではないかと考えられた。また、免疫組織化学染色を用いた解析によっても、ノックダウンマウスの卵巣内卵母細胞においてさまざまなステージの卵母細胞内に Oog1 の発現が確認された(図5)。mRNA は顕著に抑制されているにもかかわらず、タンパク質が存在したことの矛盾について考察した結果、発現する2本鎖RNAを制御しているプロモーターによるものではないかと考えられた。用いた ZP3 プロモーターは、生後数日のマウス

卵巣内卵母細胞で発現を開始する。つまり、この時期以降に発現した Oog1 mRNA は siRNA の機構によって分解されるが、この時期以前に発現する mRNA については分解することが出来ない。Oog1 mRNA は胎齢 14.5 日の卵巣内卵母細胞で発現を開始するため、この時期から生後数日までに発現した mRNA から翻訳されたタンパク質が残存し、機能したと考えることが、もっとも適切な説明となる。

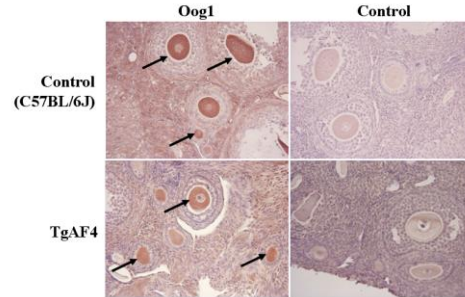


図5 Oog1ノックダウンマウス卵巣内卵母細胞におけるOog1タンパク質の発現

そこで Oog1 遺伝子を発現の開始と同時に抑制する必要があると考えられたため、ZP3 プロモーターではなく、Oog1 の発現を直接制御している領域の特定を試みた。Oog1 遺伝子は多コピーの遺伝子であり、Oog1 遺伝子と 90%以上の相同性を持つ領域が第4番染色体に2箇所、第12番染色体に3箇所あることが分かっている。これらの領域は Oog1 遺伝子をコードする4つのエクソンをすべて含んでおり、転写開始点の上流 24—31bp には TATA ボックスが存在し、実際に転写産物が作られていると考えられる。これらの領域において、転写開始点の上流域の相同性を検索し、Oog1 遺伝子の発現を制御していると予測された上流領域約 730bp と 2700bp について、プロモーター解析を行った。それぞれの領域の下流にオワンクラゲの蛍光タンパク質をコードする遺伝子を構築し、組換えマウスの作製を行った。遺伝子の組込みが確認できた系統のマウスから卵巣を取り出して、蛍光顕微鏡下で GFP の緑色蛍光を確認した結果、両領域を組み込んだマウスの卵母細胞において GFP のシグナルが確認された。このことから、用いた約 730bp および 2700bp の領域がプロモーターとして機能し、Oog1 の発現に関与していることが明らかとなった。これらの実験結果を元に、今後 Oog1 の上流領域を制御領域に持つ2本鎖RNAを発現する組換えマウスを作製することによって、胎齢 14.5 日から生後数日の間に転写された Oog1 mRNA の影響を排除した個体を作ることが可能になり、Oog1 遺伝子の機能について詳細な解析が可能となる。

胎仔卵巣内卵母細胞における Oog1 タンパク質の局在を調べた結果、Oog1 タンパク質は 14.5 日齢の胎仔卵巣内卵母細胞の細胞質において発現を開始することが明らかとなったが、胎齢 15.5 日の卵巣内卵母細胞においては Oog1 が核に局在することが明らかになった。この時期は

卵母細胞において、第一減数分裂前期に相当し、*Oog1* が第一減数分裂の過程で機能していることが示唆された。今後 *Oog1* プロモーター制御下で 2 本鎖 RNA を発現する組換えマウスを作製することによって、その関与を明らかにできる。

#### 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 6 件)

- ① Miyamoto K, Tsukiyama T, Yang Y, Li N, Minami N, Yamada M, Imai H. Cell-Free Extracts from Mammalian Oocytes Partially Induce Nuclear Reprogramming in Somatic Cells. *Biol Reprod.* 2009; 80(5):935-43.
- ② Kito, S and Ohta, Y. In vitro fertilization in inbred BALB/c mice: osmotic pressure and calcium are important factors for penetration of sperm through the zona pellucida. *Zygote*, 2008, 16:249-257.
- ③ Minami, N. Suzuki, T. and Tsukamoto, S. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *J Reprod Dev.* 2007 53(4):707-15.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 南 直治郎、初期胚の発生と遺伝子、第 27 回受精着床学会教育講演(京都), 2009.
- ② Hisashi Imaichi, Eriko Okazaki, Satoshi Tsukamoto, Yuki Ohta, Seiji Kito, Koji Kimura, Hiroshi Imai, Naojiro Minami. Z P3 promoter is not enough to analyze the early expressing genes during oogenesis, such as *Oog1* Analysis of *Oog1*, an oocyte-specific gene, using transgenic RNAi approach. 42<sup>nd</sup> Society for the Study of Reproduction (Pittsburgh, USA), 2009.

[図書] (計 2 件)

- ① Watanabe, T., Imai, H. and Minami N. Identification and Expression Analysis of Small RNAs During Development. *Methods Mol Bio.* 2008; 442: 173-185.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

南 直治郎 (MINAMI NAOJIRO)  
京都大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：30212236

##### (2) 研究分担者

鬼頭 靖司 (KITO SEIJI)  
放射線医学総合研究所・先端動物実験室・主任研究員  
研究者番号：20311376