

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700368
 研究課題名(和文) トランスポゾンを用いて生殖細胞の増殖・分化メカニズムを探る
 研究課題名(英文) Research of proliferation and differentiation in germline cells using transposon
 研究代表者
 磯谷 綾子 (ISOTANI AYAKO)
 大阪大学・微生物病研究所・助教
 研究者番号：20444523

研究成果の概要：

性転換マウスや雌雄キメラマウスの研究から、XX型やXXY型のようにX染色体を複数持つ雄性生殖細胞は誕生後に消滅してしまう。一方で、XO型の雄性生殖細胞は成熟した個体でも精原細胞として存在する。これらのことから、X染色体上に雄性生殖細胞の増殖・分化を阻害している原因領域が存在しているのではないかと考えられた。そこで、本研究では染色体上を動くトランスポゾンを用いて、その原因領域を明らかにしようと試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：トランスポゾン、生殖細胞、性染色体、遺伝子操作マウス

1. 研究開始当初の背景

性転換マウスや雌雄キメラマウスの研究から、精巣内に存在するXX型やXXY型のようにX染色体を複数持つ生殖細胞でも精巣内では雄性生殖細胞として分化することが明らかになっている。しかしながら、誕生後すぐに消滅してしまい、XX型の雄性生殖細胞が精子に分化することはない。一方で、XO型の雄性生殖細胞は精子に分化することはないが、雄性生殖細胞が消滅してしまうわけではなく、成熟した個体でも精原細胞として存

在し続けることができる。また、複数のX染色体をもつ体細胞は通常、X染色体不活化機構により1本のX染色体からのみ遺伝子が発現するように制御されているが、生殖細胞では、雌雄どちらの性に分化しても誕生するまでにX染色体の不活化が解除され、存在する全てのX染色体より遺伝子が発現ようになる。すなわち、XX型雄性生殖細胞ではX染色体上の遺伝子の発現量が2倍になることを意味する。

これらのことから、X染色体上に存在する

遺伝子の過剰発現が雄性生殖細胞の増殖・分化を阻害している原因になっているのではないかと考えられた。しかしながら、これまでの研究では、誕生直後の雄性生殖細胞の増殖・分化に関与するような分子を調べるための有用な解析ツールもなく、どのような分子が働いているのかは全く知られてない。

2. 研究の目的

(1) 誕生直後の雄性生殖細胞の増殖・分化に関与する分子を調べるための解析ツールとして、X染色体上にGFPとSryのダブルトランスジーンを持つXY型の胚性幹細胞(ES細胞)、もしくは生殖幹細胞(GS細胞)を樹立することを目的とした。

(2) X染色体を2本持つ精原細胞が消滅してしまう原因を突き止めようとしても、X染色体は2番染色体の次に長く、1500種類以上の遺伝子をコードしており、1つ1つの遺伝子についてトランスジェニックマウスを作製したり、相同組み換えによるノックアウトマウスを作製したり、自然変異を待っていたりする従来の方法による解析は多大な労力と時間を必要とするため適さない。

そこで、染色体上を動き回るトランスポゾン・トランスポゼースを用いたトラップベクターと樹立したSryのトランスジーンをもつES細胞もしくは、GS細胞を組み合わせ、X染色体上の遺伝子を標的としてランダムに変異を入れ、精原細胞が消滅してしまう原因候補遺伝子(群)を絞り込み、原因を分子生物学的なレベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) XY型Sry-TGマウスの雄と当研究室で作出したX染色体上にGFP遺伝子が挿入されたマウス(X-GFP)の雌を交配させると、 $X^{GFP}Y$ Sry-TGの雄を得ることができる。この $X^{GFP}Y$ Sry-TGの雄マウスを野生型の雌と交配させて誕生するマウスの中にGFPの蛍光を持つ雄がいるが、これはSryのトランスジーンを持つXX型性転換マウスと、簡単に判定することができる(図1)。従って、この系を利用し、 $X^{GFP}Y$ Sry-TGのES細胞、もしくはGS細胞を樹立して、トラップベクターの導入に用いれば、作製したキメラマウスから誕生するGFPの緑色蛍光を持つ雄の子供は全て、XX型性転換マウスであり、F1ですぐに解析が行え、

非常にスクリーニングが行いやすくなる。これと同時に、トラップベクター内にGFP遺伝子を導入することも想定して、Sryのトランスジーンを持つがGFP陰性のES細胞および、GS細胞の樹立も試みた。この場合も、X染色体上にトラップベクターを挿入させるので、 $X^{GFP}Y$ Sry-TGのES細胞、もしくはGS細胞と同様にF1で解析が行えることになる。

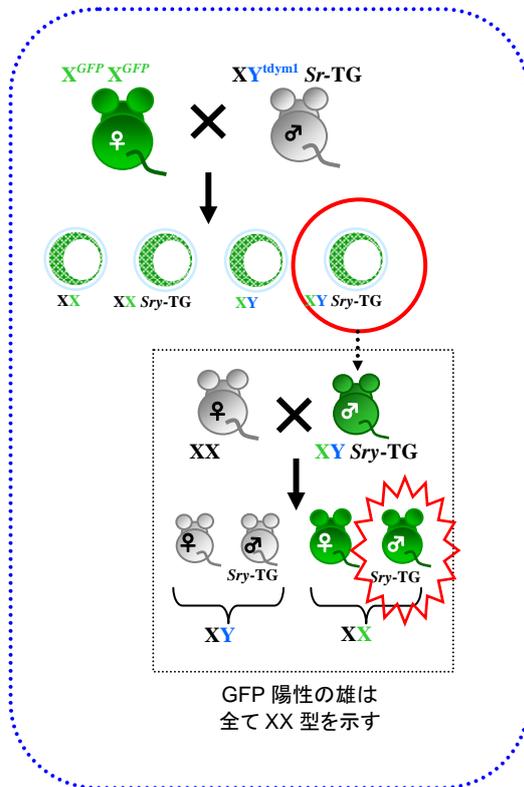


図 1. XX 型性転換マウスの簡易判定法の確立

X染色体上にGFP遺伝子を持つ雄マウス(X-GFPマウス)から生まれる子供でGFP蛍光をもつものはXX型の核型を示す。さらに、Sryのトランスジーンを持てばXX型でも雄の表現形を示すことから、X-GFPマウスとSryトランスジーンを組み合わせれば、XX型性転換マウスをGFP蛍光と、外生殖器の形態のみで、容易に判定することができる。

(2) 樹立したES細胞が生殖系列細胞に寄与するかどうかを判定するために、胚盤胞にインジェクションを行い、キメラマウスを作製し、野生型の雌と交配させて、germline transmissionを評価することにした。一方、GS細胞は生殖細胞が完全に消滅してしまうXX型Sry-TGマウスの精巣内(図2)に精細管内移植を行い、半数体を形成するのかどうかを指標に分化を評価した。

(3) トランスポゾンを含むトラップベクターをX染色体のどこの箇所に挿入させるかを

絞り込むために、既に精原細胞で発現が確認されているX染色体上の遺伝子について、XY型とXX型の精巣からトータルRNAを抽出し、発現量に差がみられるかどうかをRT-PCR法によって比較検討した。

さらに、発現量に差が見られた遺伝子について、X染色体上の存在位置をマッピングし、クラスターを形成していないかどうかを評価した。

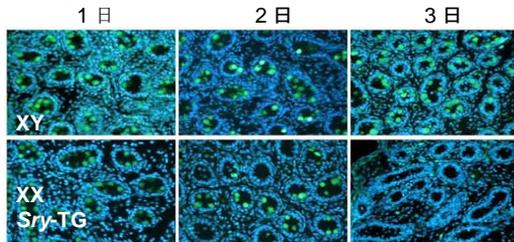


図 2. 誕生後に見られる精巣内生殖細胞数の変化
誕生 2 日目までは XX 型 Sry-TG の精巣でも生殖細胞が確認できるが(下段、左、中)、誕生 3 日目になると、ほとんど見られなくなる(下段、右)。

Green: GFP (生殖細胞)
Blue: Hoechst33258 (細胞の核)

(4) 樹立したSryのトランスジーンを持つES細胞および、GS細胞のX染色体上にトランスポゾンで挟まれたLoxP配列を挿入する(図3)ためのベクター構築を行った。また、トランスポゾンが染色体上を移動する際にはトランスポゼースであるスリーピング・ビューティー(SB)が必要になるが、トランスポゾンの染色体上の移動が精子形成の間に起こるように制御するベクターの構築を行った。

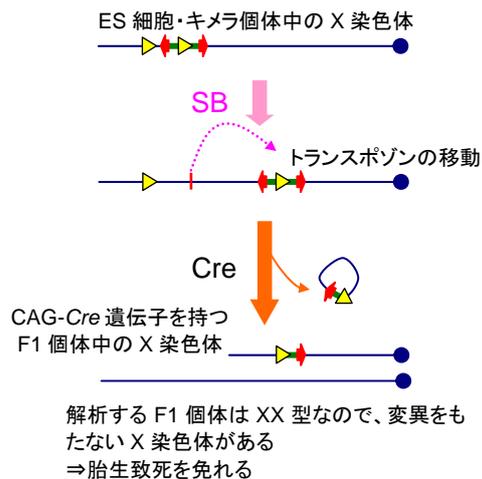


図 3. トランスポゾンを用いた、染色体の広範囲欠損モデルのストラテジー

4. 研究成果

(1) トラップベクターを生殖系列に乗せ、迅速に解析できるようにするために、SryトランスジェニックES細胞の樹立を試みた。

X染色体上にGFP遺伝子を持つ(X-GFP)ES細胞はB6コンジェニック系統のX-GFP雌とB6コンジェニック系統のSry-TGを交配させて樹立を試みたが、これらからはES細胞を樹立することができなかった。そこで、ES細胞が樹立しやすいと言われている129S2/Sv系統の雌とB6コンジェニック系統のSry-TGを交配させて樹立を試みたが、129S2/Sv系統の雌は性ホルモンの感受性が低く、充分量の胚を得ることができず、この系統を用いても129S2/Sv系統のF1からES細胞を樹立することができなかった。そこで、129S2/Sv系統の代わりに性ホルモンに対して感受性の高いC3H系統を用いることによって、SryのトランスジーンをもつES細胞を樹立することができた。

また、ES細胞が樹立できるまでの間に、別の手段として、生殖系列の細胞株であるSryトランスジェニックGS細胞を樹立した。

(2) SryのトランスジーンをもつES細胞は樹立に時間がかかったために、本研究期間内にgermline transmissionの確認までには至らなかった。

一方、先に樹立できたSryトランスジェニックGS細胞を1週齢のXX Sry-TGに移植し、10週間後に精巣切片を作製したところ、半数体の精子細胞が確認でき、雄性生殖細胞として分化する性質を持っていることが確かめられた。

(3) トランスポゾンを含むトラップベクターをX染色体のどこの箇所に挿入させるかを絞り込むために、野生型の精原細胞で発現が報告されている9個のX染色体上の遺伝子と過去に研究代表者が行ったDNAマイクロアレイの解析によってXX型とXY型の雄性生殖細胞で遺伝子発現量に差の見られた26個のX染色体上の遺伝子について、XY型とXX型の精巣を用いて、mRNAの発現量の差をRT-PCRレベルで調べた。その結果、XX型で増加している遺伝子が9個みつかった。これら発現量に差の見られた遺伝子について、X染色体上の位置をマッピングしたが、クラスターのように1箇所に集中しているわけではなかった(図4)。

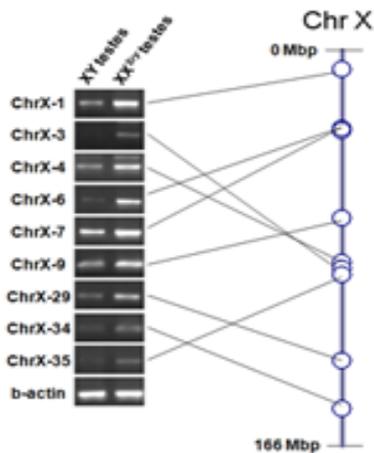


図 4. XY 型と XX 型精巢で遺伝子発現量の異なる X 染色体上の遺伝子とその染色体上の位置

(4)トランスポゼースであるスリーピング・ビューティー(SB)が雄性生殖細胞特異的に発現するよう制御するために、精母細胞以降の生殖細胞に発現することが知られているプロタミン1プロモーターとカルメジンプロモーターでSBの発現が制御されるベクターを構築した。また、トランスポゾンで挟まれたLoxP配列をX染色体上に挿入するためのベクター構築も試みていたが、本研究期間内に本研究にて樹立できたSryのトランスジーンをもつES細胞、GS細胞に導入することはできなかった。

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 Tokuhiko K, Hirose M, Miyagawa Y, Tsujimura A, Irie S, Isotani A, Okabe M, Toyama Y, Ito C, Toshimori K, Takeda K, Oshio S, Tainaka H, Tsuchida J, Okuyama A, Nishimune Y, Tanaka H., Meichroacidin containing the membrane occupation and recognition nexus motif is essential for spermatozoa morphogenesis, *The Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 283, 2008, 19039-48

〔学会発表〕(計 1 件)

- ① 磯谷綾子、雌雄キメラマウス用いた生殖細胞における性分化の解析、第 54 回日本実験動物学会総会、2007 年 5 月 23 日、東京

〔図書〕(計 1 件)

- ① 磯谷綾子、岡部勝、共立出版、蛋白質 核酸 酵素「生殖細胞の発生・エピジェネティクスと再プログラム化」、2007 年、p2060-2066

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯谷 綾子 (ISOTANI AYAKO)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20444523

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者